

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



**“EVALUACION DE COMPUESTOS FENOLICOS, LIGNINAS, AMINOÁCIDOS Y
CARBOHIDRATOS EN *Theobroma cacao* L. PROCEDENTES DE TRES
AMBIENTES DISTINTOS: BOSQUE HÚMEDO TROPICAL, BOSQUE SEMI-
HÚMEDO TROPICAL Y BOSQUE SECO”**

Trabajo Especial de Grado
Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Diego Quintero para
optar por el título de Licenciado en
Química.

Caracas, Mayo de 2012.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**EVALUACION DE COMPUESTOS FENOLICOS, LIGNINAS, AMINOÁCIDOS Y
CARBOHIDRATOS EN *Theobroma cacao* L. PROCEDENTES DE TRES
AMBIENTES DISTINTOS: BOSQUE HÚMEDO TROPICAL, BOSQUE SEMI-
HÚMEDO TROPICAL Y BOSQUE SECO.**

Presentado por:

Br. Diego Quintero

Tutores:

Dra. Daynet Sosa

Dra. María Rodríguez

Caracas, Mayo de 2012.

ÍNDICE.

1. Introducción	1
1.1 Reseña histórica de las características y uso de T. Cacao	1
1.2 Clasificación taxonómica	2
1.3 Producción mundial y nacional de cacao	4
1.4 Cultivo de cacao en Venezuela.....	6
1.5 Metabolitos secundarios	9
1.6 Función de los metabolitos secundarios en plantas.....	14
2. Antecedentes	18
3. Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
4. Metodología Experimental	22
4.1. Diseño experimental.....	21
4.2. Materiales y reactivos.....	24
4.3. Equipos.....	25
4.4. Métodos	26
4.4.1 Análisis cuantitativo y cualitativo de los compuestos fenólicos presentes en T. Cacao procedente de tres ambientes distintos	26
4.4.1.1. Extracción de fenoles.....	26
4.4.2.2. Análisis cuantitativo de fenoles por CCF.....	26
4.4.1.3 Cuantificación de fenoles totales.....	27

4.4.2 Análisis cualitativo y cuantitativo de carbohidratos no estructurales presentes en T. Cacao procedente de tres ambientes distintos.....	28
4.4.2.1. Extracción de carbohidratos.....	28
4.4.2.2. Cuantificación de carbohidratos.....	28
4.4.2.3. Análisis cualitativo de carbohidratos por CCF.....	28
4.4.3 Análisis cualitativo y cuantitativo de aminoácidos presentes en T. Cacao procedente de tres ambientes distintos.....	29
4.4.3.1. Cuantificación de aminoácidos (prolina libre).....	29
4.4.3.2. Análisis cualitativo de aminoácidos por CCF.....	29
4.4.4 Análisis cuantitativo de ligninas presentes en T. Cacao procedente de tres ambientes distintos.....	29
4.4.4.1. Extracción de ligninas.....	29
4.4.4.2. Cuantificación de ligninas.....	30
4.5 Análisis estadístico.....	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
5.1 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	31
5.1.1. Cuantificación de compuestos fenólicos solubles.....	31
5.1.2. Cuantificación de compuestos fenólicos ligados.....	35
5.1.3. Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	36
5.1.4. Análisis cualitativo de fenoles por CCF.....	39

5.2 Cuantificación de carbohidratos no estructurales.....	44
5.2.1. Análisis cualitativo de carbohidratos por CCF.....	48
5.3 Cuantificación de prolina libre.....	49
5.3.1. Análisis cualitativo de aminoácidos por CCF.....	52
5.4 Cuantificación de ligninas.....	53
6. CONCLUSIONES.....	56
7. REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS.....	57
8. ANEXOS.....	68

RESUMEN

En este Trabajo Especial de Grado se determinó el contenido compuestos fenólicos, ligninas, aminoácidos y carbohidratos en seis (6) clones de *Theobroma cacao L.* procedentes de tres localidades distintas: Padrón (bosque húmedo tropical), Tesoro (bosque semi-húmedo tropical) y Tacariguita (bosque seco tropical), con el fin de evaluar la influencia ambiental sobre la producción de dichos compuestos.

Se realizó una recolección del material foliar de los seis clones de cacao procedentes de cada ambiente, luego de esto se procedió a realizar una extracción utilizando una solución de metanol para extraer los compuestos fenólicos solubles y una etanólica para aminoácidos y carbohidratos, mientras que para los fenoles ligados y ligninas se realizó una hidrólisis básica del material foliar que quedó como residuo. La cuantificación se llevo a cabo utilizando la técnica de fotolorimetría, usando un espectrofotómetro TECAN modelo InfiniteM200 (intervalo de barrido: 190-900nm). Luego de ser procesada la data se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA).

Después de cuantificar los metabolitos contenidos en el material foliar se encontró que para los compuestos fenólicos, no existen diferencias entre los clones estudiados. También se evidenció que la biosíntesis de las ligninas en material foliar fue mayor en los clones procedentes de Padrón (bosque húmedo tropical) en comparación con las otras localidades. En el caso de los carbohidratos no estructurales se encontró una mayor acumulación de estos en los clones procedentes de Tacariguita (bosque seco tropical), mientras que la acumulación de prolina libre fue mayor en los clones procedentes del bosque húmedo tropical.

El análisis cualitativo de los extractos foliares obtenidos de los clones de cacao, se realizó utilizando la técnica de cromatografía en capa fina.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a mi mamá Nora Ramos y a mi papá Ramón Quintero por haberme apoyado de manera incondicional en mis estudios y cuestiones personales a lo largo de mi vida. De igual manera quiero agradecer a mi abuela Betulia Rodríguez y a mi tía Ofelia Bolívar que como unas madres me educaron, son muchas las enseñanzas que me han dejado. Gracias a mis hermanos Olieska Ramos y Otniel Ramos por el apoyo, ellos también forman parte de este logro. No puedo dejar de nombrar a mi tía y madrina Carmen Yolanda Rodríguez, que siempre ha creído en el potencial que existe en mi como buena persona y estudiante. Al resto de mi familia muchísimas gracias.

Me siento muy orgulloso de haber cursado mis estudios de pregrado en la Universidad Central de Venezuela y que felicidad siento de ser ucevista.

Quiero agradecer a mi profesora de química orgánica y tutora de tesis la Dra. María Rodríguez por la paciencia que me tiene, por los consejos, por todo lo que me enseñó y por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella. De igual manera le doy las gracias a mí otra tutora la Dra. Daynet Sosa por el apoyo brindado y el esfuerzo invertido durante todo este tiempo. Sin ellas este trabajo no lo hubiese logrado.

Estoy seguro que sin el apoyo y la ayuda incondicional de mi amiga del alma Nataly Nunes, su mamá la Sra. Luci Andrade y el resto de su familia, no hubiese llegado hasta aquí, mil gracias. Mi compañero de estudios y mejor amigo Jean Díaz gracias por todos esos regaños, ahora sé que surtieron efecto. Yurexi Mata siempre ha estado ahí para no dejarme caer.

Al resto de personas maravillosas que conocí en mi querida universidad, profesores, amigos y compañeros de estudios, gracias totales.



1. INTRODUCCIÓN

1.1-RESEÑA HISTORICA DE LAS CARACTERISTICAS BOTÁNICAS Y USO DE *THEOBROMA CACAO* L.

Theobroma cacao L. (Figura 1), es un árbol tropical nativo de Centro y Suramérica, ligado como ningún otro cultivo a nuestro continente tanto por su historia como por su importancia comercial^[1]. Desde tiempos ancestrales, los mayas aseveraban el origen divino de la planta, denominando a la bebida obtenida de su fruto, “bebida de los dioses”. Por esta razón, Carlos Linneo clasificó el género como *Theobroma* que se deriva de las palabras griegas *Theos*: Dios y *broma*: bebida. A partir de la semilla del cacao después de aplicar tratamientos post-cosecha de fermentación, secado y torrefacción^[2], se obtiene chocolate y manteca. El árbol se cultiva comercialmente en agro-ecosistemas típicos de los bosques húmedos tropicales, concentrándose su producción mundial en una banda estrecha no mayor de 20° norte y 20° sur a partir de la línea ecuatorial^[3].

Las semillas, fermentadas y secas, constituyen la materia prima para obtener chocolate, las mismas son gruesas, de forma oblonga, ovada, elíptica o irregular y su color puede ser blanco cremoso, castaño o violeta. Esta planta fue cultivada por los mayas hace más de 3.000 años, para utilizarla en una bebida llamada *xhocalt*, y alcanzó tal valor que se utilizaba como moneda de intercambio.

En el cacao no existen variedades, pero sí dos grupos morfogénicamente diferenciados y un tercero, que corresponde al cruce entre ambos. Los términos Criollo, Forastero y Trinitario surgen, según Motamayor^[4], del vocabulario venezolano, usado mundialmente para distinguir los cacaos nativos, tradicionalmente cultivados, de los cacaos extranjeros. Los Trinitarios son producto del cruzamiento, en Trinidad, entre Amazónicos (Forasteros) y Criollos buscando resistencia a las enfermedades. Los Amazónicos son los cacaos provenientes de las Cuencas del Orinoco y Amazonas. El término Criollo se asocia al cacao de alto valor organoléptico por su aroma y gusto, proveniente de almendras gruesas aromáticas



de color claro; también se utiliza para designar los cacaos provenientes de Centroamérica (Nicaragua y México), los cuales tienen igual calidad, aroma y origen^[4].

1.2-CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La clasificación taxonómica de *Theobroma cacao* L. (NCBI, 2010) es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Género: *Theobroma*

Especie: *Theobroma cacao* L.



Figura 1.- *Theobroma cacao* L. (Foto cedida por Daynet Sosa)

La morfología y el origen geográfico han sido los parámetros determinantes en la descripción de los grupos genéticos de cacao^[5]. En el 2002 y 2003 se publicaron dos trabajos que confirmaron el origen híbrido del cacao tipo Trinitario y teniendo en cuenta la gran variabilidad genética entre y dentro de los grupos de Criollos y Forasteros se propuso una nueva clasificación en: Criollo Antiguo, Criollo Moderno, Forastero Alto Amazónico y Forastero Bajo Amazónico^[6].

Tradicionalmente, desde el punto de vista botánico, el cacao (*Theobroma cacao* L.) se clasifica como:

a. Cacao Criollo: El grupo criollo (palabra que significa nativo pero de ascendencia extranjera), se originó también en Sudamérica, pero sus variedades fueron



domesticadas en México y Centro América y son conocidas también como híbridos de cacao dulce. Son plantas de poco vigor, susceptibles a enfermedades y de bajo rendimiento, destacándose la alta calidad de sus semillas. Este tipo de cacao posee un cotiledón de color entre marfil y castaño muy claro, con un olor de cacao dulce unido a un aroma delicado característico. Se cultivan principalmente en América Central, México, Colombia y parte de Venezuela.

b. Cacao Forastero: su centro de origen es la parte alta de la cuenca del Amazonas en el área comprendida entre los ríos Napo, Putumayo y Caquetá, sus frutos son de cáscara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa y de granos aplanados, pequeños de color morado y sabor amargo; dentro de estos se destacan los tipo Cundeamor, Amelonado, Sambito, Calabacillo y Angoleta. Representa un 85% de la producción mundial, proveniente de los países de África Occidental y Brasil. Aunque el cacao tipo Forastero se caracteriza por poseer mayor vigor, rendimiento y resistencia a las enfermedades, en términos de calidad son denominados cacaos ordinarios; no así los cacaos tipo Criollo, considerados, por la alta calidad de sus semillas en el mercado mundial, como Cacao Fino o de aroma^[7].

c. Cacao Trinitario: Este grupo aparentemente se originó cuando un genotipo criollo se cruzó naturalmente con un genotipo amelonado del Brasil. Por esta razón, estos materiales presentan características morfológicas y genéticas de ambas razas. Es más resistente y productivo que el cacao “Criollo” pero de inferior calidad. Presentan granos de tamaño mediano a grande y cotiledones de color castaño. Ocupan del 10 al 15% de la producción mundial y es producido en Granada, Jamaica, Trinidad y Tobago, Colombia, Venezuela y América Central^{[8][9]}.

Sin embargo, actualmente se maneja una nueva clasificación del cacao, en reemplazo de estos 3 grupos que se mencionan (Trinitarios, Criollos y Forasteros), derivada del estudio realizado en 1241 accesiones de cacao con marcadores



moleculares con vistas a determinar la diversidad genética del mismo. Así tenemos que los 10 grupos propuestos son: Maraón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guiana^[5].

1.3-PRODUCCIÓN MUNDIAL Y NACIONAL DE CACAO.

La producción mundial de plantas de cacao se concentra en los países tropicales, principalmente en África y América, típicamente en minifundios o bajo sistemas de agricultura de subsistencia (casi el 90% de la producción de cacao corresponde a pequeños agricultores con menos de 5 hectáreas); mientras que la producción de bienes intermedios y finales se centra en los países desarrollados (Europa y América del Norte). La producción mundial de cacao está fuertemente concentrada en África (alrededor del 70% de la producción mundial). Para el año cacaotero 2009/10, el primer país productor a nivel mundial fue Costa de Marfil, con 1,24 millones de toneladas, después le siguen Ghana (632.000 tn), Indonesia (550.000 tn), Nigeria (240.000 tn), Camerún (205.000 tn) y el Brasil (161.000 tn). Luego vienen, Ecuador (160.000 tn) y Nueva Guinea (47.000 tn)^[10].

Esta producción mundial mantuvo una tendencia creciente a lo largo de los 90's, creciendo a un ritmo anual de 0,5%, pero desde 2001 se ha visto afectada por los problemas políticos imperantes en Costa de Marfil, la disminución en la producción de Indonesia y Ghana, la sustitución de cultivos hacia otros con mayores ventajas de comercialización en Malasia y el descenso del área cultivada de cacao en Brasil.

El Convenio Internacional del Cacao, firmado en 1995, reconoce solamente a 17 países como productores de cacao fino de aroma. América Latina y el Caribe suministra el 80%, Asia el 18% y África el 2%. En el continente americano, Ecuador es el mayor abastecedor con 115.000T en 2006, le siguen Colombia (30.000T) y Santo Domingo (42.000T), según el Informe de ICCO (2006)^[11].

La importancia de Latinoamérica en el cultivo de cacao viene cayendo, representando alrededor del 14% en el año 2010 (21,9% en el 1990). En Sudamérica la producción es liderada por Brasil y Ecuador^[10].



El consumo del cacao está íntimamente ligado a la producción de chocolate en el mundo, por lo que las tendencias que se dan en este mercado marcan las tendencias de consumo y producción para el cacao^[12].

La producción y la comercialización de chocolate en el mundo está dominada por aproximadamente 10 transnacionales. Holanda es el principal centro de comercio y de molienda en la Unión Europea. Alemania y Francia (en ese orden) son los principales transformadores y consumidores de chocolate. Asimismo, ha surgido un mercado de alto dinamismo en el consumo de preparados de chocolate en los últimos cinco años formado por Canadá, México, Brasil, Italia, Japón y España^[13].

La presencia venezolana en el mercado internacional del cacao se caracteriza más por su alta calidad que por el volumen comercializado, contribuyendo actualmente con el 0,64% de la producción (un estimado de 15.000 toneladas) y aproximadamente el 0,32% de las exportaciones mundiales. Estos materiales producidos en el país son denominados como “finos de aroma”^[14-16]

Tabla 1. Producción nacional de cacao^[17].

Año Cosecha	Producción (ton)	Rendimiento (Hg/Ha)	Área cosechada (Ha)
2007	18911	3322	56927
2008	20457	4076	50194
2009	20000	4000	50000
2010	21300	4401	48400

La producción nacional, mostrada en la **Tabla 1** está distribuida en tres zonas geográficas y se concentra en algunos estados costeros, llaneros y andinos. Cada región productora del país se caracteriza por presentar condiciones propias en cuanto a tamaño de la unidad de producción, condiciones geoclimáticas, genética



del material de siembra, manejo de la plantación, tratamientos post-cosecha, etc. que le permiten producir un tipo de cacao específico.

La región nororiental, conformada por los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro aporta cerca del 49% a la producción de cacao seco nacional, con mayor producción de forasteros e híbridos; la zona central conformada por los estados Miranda, Aragua, Carabobo y Yaracuy que produce un 27%, fundamentalmente de Trinitarios y Criollos; y la zona suroccidental compuesta por los estados Mérida, Zulia, Táchira, Apure, Barinas y Portuguesa, que produce el 24% del cacao prevaleciendo los Criollos puros, invaluableles por su calidad, especialmente el cacao Porcelana^[18,19].

En los últimos años la producción y la calidad del cacao venezolano se ha visto afectada por numerosos factores como son: progresiva disminución del genotipo criollo como consecuencia de hibridaciones naturales con materiales trinitarios y forasteros introducidos, causando una gran variabilidad genética y pérdida de la calidad, además de la susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades que han causado grandes pérdidas en las cosechas, aproximadamente el 20% de acuerdo con las estimaciones de los especialistas^[20]. A esta situación se suma, las precarias políticas de mercadeo, carencia de estrategias para premiar la eficiencia y calidad y de las tecnologías post-cosechas empleadas en las zonas de producción de cacao del país, insuficiente organización de los productores y la carencia de programas integrales de extensión. Todos estos factores han provocado una caída de la calidad y de poco estímulo hacia el productor y de la falta de una política seria y cónsona con la realidad del sector cacaotero del país^[21].

1.4-CULTIVO DE CACAO EN VENEZUELA.

En nuestro país el cultivo del cacao se encuentra distribuido en diferentes regiones (oriental, central y occidental) y bajo distintos sistemas de explotación; registrándose en cada una de estas regiones, la existencia de materiales con características asociadas a una calidad intrínseca diferencial, lo que ha conllevado a que se pueda

Evaluación de de compuestos fenólicos, ligninas, aminoácidos y carbohidratos en *Theobroma cacao* L. procedentes de tres ambientes distintos: bosque húmedo tropical, bosque semi-húmedo tropical y bosque seco. UCV 2012.



tener una diversidad de cultivares con respuestas o tolerancia a variaciones y fluctuaciones de los parámetros climáticos similar a la que existe en el mundo (desde México hasta el Amazonas), lo que ha propiciado una alta cantidad de tipos o cultivares, producto de procesos de domesticación y adaptación a condiciones climáticas muy particulares.

Tenemos por tanto que la región oriental se caracteriza por la mayor producción de los tipos Forasteros e Híbridos, en la Zona Central conseguimos los tipos Trinitarios y Criollos y en la región occidental existen los Criollos puros, invaluable por su calidad, especialmente el cacao tipo Porcelana (CAPEC, Cámara Venezolana del Cacao, 2007).

A pesar de la pérdida de importancia relativa dentro de la economía nacional y los bajos rendimientos, alrededor de 310 Kg/ha^[22]; el cacao criollo venezolano sigue siendo un representante del cacao fino, capaz de producir chocolate de la mejor calidad y proporcionando una almendra con aroma afrutado y un sabor característico demostrado por Sukha y Buttler^[23], quienes afirman: “Los cacaos criollos venezolanos son organolépticamente distintos al resto de los cacaos probados en el experimento (Trinidad, Ghana y Ecuador)”. Por lo tanto el papel de Venezuela en el mercado internacional se destaca más por la calidad del producto que por los volúmenes comercializados^[24].

La calidad del chocolate depende fundamentalmente de la calidad de la almendra; y según Reyes *et al.* (1999), la calidad de la misma está influenciada por los siguientes factores: genotipo (cultivar o grupo de cacao), el clima, los suelos donde se cultiva, el manejo agronómico y fitosanitario que se ofrezca a la plantación y la tecnología que se emplee para el beneficio^[25].

Existe una escasa e inconsistente información técnica sobre los efectos reales de los factores ambientales en la calidad organoléptica del cacao. Sin embargo, algunos investigadores concluyen que su efecto es bajo si se compara con el efecto del genotipo y el tratamiento de postcosecha. No obstante, los efectos individuales



y/o sinérgicos de estos factores, podrían estar afectando (favorable y/o desfavorablemente), los atributos organolépticos de la almendra del cacao, por lo que no se podría descartar la influencia de estos factores en la calidad final del producto^[26].

Sin embargo, Reyes *et al.* (1999) mencionan que por ejemplo, el clon Ocumare 61 sembrado en los valles litorales de Aragua (bosque seco tropical) presenta un índice de almendra inferior, que cuando crece en la zona de Barlovento (bosque húmedo tropical). Y Quiroz (2012) menciona que la deficiencia de agua y nutrientes en el suelo, trae como consecuencia una reducción en el tamaño de las almendras, por tanto, de las mazorcas; y que además origina variaciones significativas en la composición bioquímica de los cotiledones; el metabolismo del nitrógeno de la planta es sensible al medio ambiente^[25,27].

En consecuencia, garantizar la calidad del cacao venezolano es de vital importancia para el mantenimiento de los estándares requeridos en la exportación de este rubro. Por esta razón, se hace imperativa la adecuación y mejora de nuestros cultivares ante la presencia de factores en el medio ambiente que comprometen el acervo genético de nuestro cacao, el cual históricamente ha sido reconocido como uno de los de más alta calidad culinaria a nivel mundial.

Las plantas, al igual que otros organismos, están sometidas a diferentes tipos de estrés ambiental, lo que causa importantes pérdidas en las cosechas y en la calidad de los productos obtenidos; y estos efectos son a menudo específicos de un lugar o de un cultivo. Los desencadenantes son numerosos y abarcan desde el aumento de radiación UV, déficit hídrico, alta salinidad, toxicidad de los metales, de herbicidas, de fungicidas, de los contaminantes del aire, incrementos de la radiación UV, la temperatura, la topografía y la hipoxia (bajo suministro de oxígeno en suelos anegados y compactados). Además, en la naturaleza las plantas están expuestas a un gran número de organismos patógenos como insectos, hongos, bacterias y virus. Esto hace pensar que los mecanismos de defensa de las células vegetales, tanto aquellos constitutivos como aquellos inducidos por la presencia de un estrés biótico



o abiótico, son muy efectivos para detener o contrarrestar los mismos^[28]. Además, se ha comprobado que las plantas son capaces de reaccionar ante estímulos externos, como puede ser la intensidad de luz, la cantidad de agua o la presencia de algunas sustancias en los alrededores. Las plantas poseen un patrón de conducta lineal, según el cual actúan de forma directa ante cualquier estímulo. La agresión o estrés ambiental que sufre la planta desencadena una serie de reacciones bioquímicas por las que se liberan sustancias conocidas como metabolitos secundarios^[29]. Teniendo en cuenta el efecto combinado de la interacción genotipo-ambiente, se hace imprescindible entender los componentes de esta interacción para su aplicación en programas de mejoramiento genético con vistas a obtener plantas más adaptadas a ambientes determinados.

En lo que respecta a Venezuela, se hace indispensable entender las diferencias (bioquímicas, fisiológicas y moleculares) como respuesta de los diferentes genotipos a varias condiciones agroclimáticas; teniendo en cuenta, por ejemplo, que el contenido de C, N, ligninas y polifenoles varía ampliamente a nivel inter e intra específico^[30]; dependiendo de la especie, parte de la planta, fertilidad del suelo y disponibilidad de agua^[31].

1.5- METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS.

Se llama metabolismo primario de las plantas a los procesos bioquímicos esenciales que intervienen en forma directa en su supervivencia (crecimiento y desarrollo). A través de los mismos se sintetizan y degradan compuestos que participan en estos procesos o son parte estructural de las plantas, tales como: carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos, polímeros (polisacáridos, proteínas, lípidos, ADN y ARN) etc.

Los carbohidratos son moléculas orgánicas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Son solubles en agua y se clasifican de acuerdo a la cantidad de carbonos o por el grupo funcional aldehído. Son la forma biológica primaria de almacenamiento y consumo de energía. Otras biomoléculas energéticas son las grasas y en menor medida, las proteínas.

Evaluación de de compuestos fenólicos, ligninas, aminoácidos y carbohidratos en *Theobroma cacao* L. procedentes de tres ambientes distintos: bosque húmedo tropical, bosque semi-húmedo tropical y bosque seco. UCV 2012.



Un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxílico ($-\text{COOH}$; ácido). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas. Dos aminoácidos se combinan en una reacción de condensación que libera agua formando un enlace peptídico. Estos dos "residuos" aminoacídicos forman un dipéptido. Si se une un tercer aminoácido se forma un tripéptido y así, sucesivamente, para formar un polipéptido. Esta reacción ocurre de manera natural en los ribosomas, tanto los que están libres en el citosol como los asociados al retículo endoplasmático.

Todos los aminoácidos componentes de las proteínas son alfa-aminoácidos. Por lo tanto, están formados por un carbono alfa unido a un grupo carboxilo, a un grupo amino, a un hidrógeno y a una cadena (habitualmente denominada Radical) de estructura variable, que determina la identidad y las propiedades de los diferentes aminoácidos; existen cientos de cadenas R por lo que se conocen cientos de aminoácidos diferentes, pero sólo 20 forman parte de las proteínas y tienen codones específicos en el código genético.

Debido a su carácter universal en el reino de las plantas, los procesos que intervienen en el metabolismo primario y sus metabolitos, se encuentran en todas las plantas sin excepción^[29].

Sin embargo, durante el metabolismo secundario se sintetizan y degradan ciertos compuestos (metabolitos secundarios) como: Terpenos, Alcaloides, Compuestos fenólicos y glicósidos (saponinas, alcaloides glicosilados etc.) que están restringidos a estados específicos del desarrollo del organismo y células especializadas; como respuesta al estrés biótico y abiótico y están usualmente asociados a un genotipo o grupo taxonómico determinado.

Los tipos de metabolismo (primario y secundario) están fuertemente interconectados, por lo que se hace difícil el establecimiento de una división entre ambos. El hecho de que la expresión del metabolismo secundario sea una característica de la especialización, indica que la formación del compuesto secundario, en contraste con el compuesto primario, no tiene una importancia directa para la célula productora. Sin embargo el compuesto secundario puede tener



significación para el organismo productor como un todo. Los metabolitos secundarios están implicados en las interacciones ecológicas de la planta productora con el medio ambiente que la rodea. También se diferencian de los metabolitos primarios en que cada uno de ellos tiene una distribución restringida en las plantas, a veces en sólo una especie o un grupo de ellas, por lo que muchos de ellos son útiles en Botánica Sistemática^[28].

En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas. El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo en este campo; por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, la creciente apreciación de los diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente, en el contexto de las interacciones ecológicas^[32-34].

Los metabolitos secundarios en las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biosintéticos:

- A. *Terpenoides.*** Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, son derivados de los radicales IPP (Isopentenildifosfato) y DMAPP (dimetilalilpirofosfato) su biosíntesis transcurre a través de la vía del ácido mevalónico. Es un extenso grupo de metabolitos que han mostrado diversas e interesantes actividades biológicas como antihipoglucemiantes, antitumorales, etc^[35]. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. Unos pocos, como los que forman los aceites esenciales, están restringidos a solo algunas plantas.
- B. *Compuestos nitrogenados o alcaloides.*** Se conocen alrededor de 12.000 alcaloides, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, biosintetizados principalmente, a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran



diversidad de estructuras químicas^[36] y son fisiológicamente activos en los animales aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estricnina^[37].

C. Compuestos fenólicos: fenilpropanoides y sus derivados. Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen son sintetizados por las plantas o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato.

Dentro de la amplia familia de los compuestos fenólicos que comprende fenoles simples, ácidos benzoicos y sus derivados, ácidos cinámicos y cumarinas entre otros, destacan los flavonoides que son sustancias naturales que poseen un esqueleto básico de 15 átomos de carbono C₆-C₃-C₆, constituido por dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de 3 átomos de carbono. El anillo A es derivado de la cadena policética, el B es derivado del ácido Shikímico, con sustitución orto, y los 3 átomos de carbono que se unen a estos anillos, corresponden a la parte alquílica del fenilpropano^[37].

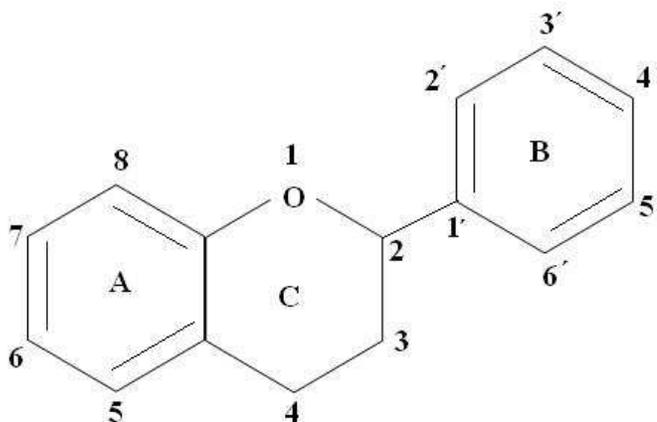


Figura 2. Esqueleto Flavano.

Los flavonoides están presentes en todas las partes de las plantas: raíces, troncos, hojas, frutos, flores y semillas. El estado de oxidación del anillo



central determina varios grupos estructurales. La proporción de oxigenación varía y puede presentarse como -OH, -OMe y/o formando glicósidos. La hidroxilación de los anillos aromáticos ocurre frecuentemente en las posiciones 7 y 4', algunas veces en 5 y 3', pocas veces en 5 y 8, escasamente en 6 y 2'. Por lo general, los flavonoides son polares y esta propiedad se aprovecha para su aislamiento. La extracción con agua o solventes acuosos puede presentar algunas desventajas como lo es la posible coextracción de otros compuestos^[37].

Entre los tipos de flavonoides resaltan las **flavanonas**, presentando casi siempre las de origen natural una configuración **2S**, que dispone al anillo **B** ecuatorial. Esta estereoquímica está asociada a las propiedades levorrotatorias de tales moléculas. Las flavanonas pueden presentarse como O- y C- glicósidos y también pueden observarse O- y C- metilaciones o alquilaciones superiores. El análisis cualitativo de los compuestos fenólicos por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de extractos de *Theobroma cacao L.* mostró una acumulación significativa de algunos derivados de luteolina y apigenina. En la figura 3 se muestra las estructuras de éstos compuestos^[38].



Figura 3. Estructuras de las flavanonas Luteolina (A) Apigenina (B) presentes en *Theobroma cacao L.* ^[38].

El modelo de estructuras con el esqueleto flavano con uno o dos grupos -OH en el anillo heterocíclico se conoce como flavanoles; hay así, flavan-3,4-



dioles, flavan-4-oles y flavan-3-oles, o catequinas. *Theobroma cacao* L. posee altos contenidos de catequina y epicatequina, en la figura 4 se presentan las estructuras de estos compuestos^[39].

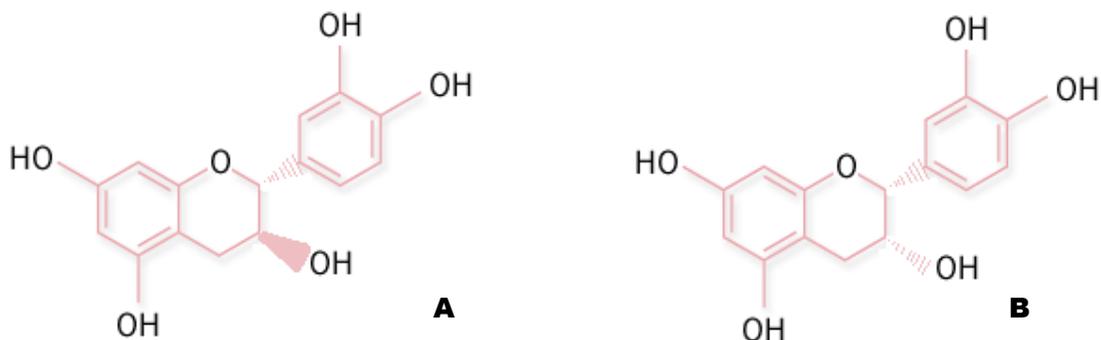


Figura 4. Estructuras de los flavanoles Catequina (A) y Epicatequina (B) presentes en *Theobroma cacao* L.^[39].

1.6- FUNCIÓN DE LOS METABOLITOS PRIMARIOS (Aminoácidos y carbohidratos) Y SECUNDARIOS EN PLANTAS (Compuestos fenólicos y Ligninas).

Ante condiciones estresantes, bien sean provocadas por factores abióticos (sequía, inundación, temperaturas extremas, sales excesivas, metales pesados, irradiación de alta intensidad) o bióticos (plagas y enfermedades), se desencadena en las plantas una serie de respuestas tales como la biosíntesis de metabolitos secundarios y la activación simultánea de la síntesis de proteínas específicas denominadas de estrés, hasta cambios en el desarrollo y/o reproducción de las plantas.

Los carbohidratos de las plantas se dividen en dos grupos: estructurales y no estructurales CNET (carbohidratos no estructurales). Los primeros forman parte de la pared celular^[40] y entre éstos se encuentran la celulosa, la hemicelulosa y la

Evaluación de de compuestos fenólicos, ligninas, aminoácidos y carbohidratos en *Theobroma cacao* L. procedentes de tres ambientes distintos: bosque húmedo tropical, bosque semi-húmedo tropical y bosque seco. UCV 2012.



pectina. Estos, son causantes de la fibrosidad del alimento, no están disponibles para el metabolismo energético de la planta, son insolubles en agua y poseen una fermentabilidad potencial lenta y limitada. La pectina constituye una excepción ya que es completamente fermentable en el rumen (sistema digestivo de los animales rumeantes)^[41]. Los segundos se almacenan en órganos vegetativos como raíces, rizomas, estolones, coronas y parte inferiores del tallo^[42]. Los principales CNET en los tejidos de especies forrajeras son monosacáridos como glucosa y fructosa, disacáridos como sucrosa y maltosa y polisacáridos como almidones y fructosanos. Los CNET proporcionan la energía para el rebrote de las especies forrajeras perennes o anuales, que pueden ser cosechadas varias veces en una misma temporada. Además ayudan a sobrevivir a las forrajeras durante períodos de sequía, de inundación, de altas o de bajas temperaturas y proporcionan energía para el crecimiento cuando las condiciones ambientales son nuevamente favorables^[43].

Después de la celulosa, la sustancia orgánica más abundante en las plantas son las ligninas, polímeros altamente ramificados de fenilpropanoides que forman la pared celular en las plantas. La estructura precisa de las ligninas no se conoce debido a su difícil extracción, pues se unen covalentemente a la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular. A diferencia de polímeros como almidón, goma, o la celulosa, las unidades de ligninas no parecen estar vinculadas de una manera sencilla. La rigidez mecánica de las ligninas fortalece los tallos y el tejido vascular, lo que permite el crecimiento hacia arriba y que el agua transporte los minerales bajo presión negativa sin colapso del tejido. Debido a que las ligninas son un componente clave del tejido de transporte de agua, la capacidad de producir ligninas es una de las adaptaciones más importantes para las plantas primitivas permitiendo así que colonizaran tierra firme. Además de proporcionar soporte mecánico, las ligninas tienen importantes funciones de protección, su resistencia física disuade a la alimentación de los animales, y hace que sea relativamente no digerible para los herbívoros. La lignificación bloquea el crecimiento de patógenos y es una respuesta frecuente a las infecciones o lesiones^[29].



Al aminoácido prolina se le considera como uno de los osmoprotectores para la resistencia a las condiciones de sequía y salinidad^[44]. Su acumulación en los tejidos sometidos a tensión hídrica y su síntesis neta parece provenir de los carbohidratos por vía del cetoglutarato y del glutamato. En un tejido turgente la oxidación de prolina es muy rápida, mientras que, bajo condiciones de déficit hídrico se inhibe la oxidación de Prolina lo cual aumenta la concentración de la misma. La acumulación de prolina bajo el estrés hídrico alcanza entre 10 -100 veces más que cuando la célula está turgente, y hay evidencia de que la acumulación de prolina se debe a la síntesis nueva, más que a un rompimiento de las proteínas^[45]. En las plantas sometidas a estrés, la prolina desempeñaría las siguientes funciones: a) Participación en el ajuste osmótico del comportamiento citoplasmático; b) Protección de membranas; c) Participación en la regulación del pH citoplasmático; d) Nexo entre la síntesis de prolina con el metabolismo de los glúcidos; e) Establecimiento de una reserva de N₂ en la fase de recuperación del estrés; y f) Bloqueo del crecimiento celular^[44].

Los fenoles, terpenoides y alcaloides son los tres grupos principales de metabolitos secundarios en plantas, e influyen en un amplio rango de actividades fisiológicas relacionadas con la protección de las plantas a varias formas de estrés ambientales (biótico y abiótico)^[29].

En este sentido, los compuestos fenólicos representan un claro ejemplo de la plasticidad metabólica que permite a las plantas adaptarse a los cambios del entorno biótico y abiótico; y a la vez proporcionarnos productos vegetales de amplio uso como saborizantes, colorantes y antioxidantes. Esto último, ha estimulado una amplia gama de estudios biológicos y epidemiológicos con el objetivo de caracterizar las propiedades antioxidantes de estos compuestos frente a enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, así como en productos antienviejimiento o cosméticos^[46]. No obstante, teniendo en cuenta el incremento del interés de la humanidad en caminar en un futuro mediano hacia el desarrollo sostenible, se ha estimulado la investigación sobre la síntesis de



compuestos fenólicos para la mejora de la biomasa vegetal y para un mejor control de la sanidad vegetal y animal.

El cambio en la concentración de fenoles en los tejidos de las hojas está implicado en una serie de importantes procesos ecológicos para la planta (resistencia a microorganismos, insectos y herbívoros; adaptaciones morfológicas y bioquímicas) y para el ecosistema en sí (descomposición de la hojarasca, formación del humus, etc., factores que están relacionados con las tasas de rotación de la materia orgánica y la mineralización de los elementos)^[30]. Por lo tanto, los perfiles fenólicos de las plantas superiores son el resultado de largos y complejos procesos de evolución y coevolución; y la cantidad de los mismos y los factores que controlan su producción en el tejido de la hoja pueden tener consecuencias de gran alcance para el entorno (ecosistema), así como para las interacciones entre especies (alelopatía)^[47].

Esta producción de compuestos fenólicos en las plantas es muy variable y se encuentra bajo un control genético y uno ambiental. La variación genética a nivel de especie es más evidente^[48], pero también puede ocurrir una variación a nivel poblacional como sugirieron Alston^[49] y Schultz^[50]. La influencia ambiental sobre la producción de compuestos fenólicos viene dada por el aumento de la radiación solar total, el aumento de la radiación ultra-violeta, la disponibilidad de humedad, o la nutrición mineral del suelo^[51]. Por lo que, estas influencias determinan los patrones vegetativos así como la fisiología del crecimiento de las plantas.

En particular las flavonas y flavonoles presentes en flores, hojas y tallos cumplen la función de proteger las células de la excesiva radiación UV-B (280-320 nm), ya que se acumulan en las capas de la epidermis de las hojas y los tallos y absorben la luz en la región del UV-B. Además, la exposición de las plantas al aumento de luz UV-B aumenta la síntesis de flavonas y flavonoles en las plantas^[29].



2. ANTECEDENTES

Los trabajos que se citan a continuación, muestran la interacción de las plantas con el medio ambiente, y como esta interacción afecta la producción de metabolitos en *Theobroma cacao* L. y otras especies.

En 1983, Sahai y Shulert^[52] estudiaron el efecto de la temperatura, la iluminación y la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de compuesto fenólicos en *Nicotiana tabacum*, observando un aumento en la producción de compuestos fenolicos inducidos por el incremento de la temperatura e iluminación, lo que demuestra una relación entre la producción de metabolitos secundarios y la respuesta ante cambios en el entorno. De igual forma, Muller y col. en 1987^[47] observaron que al someter el cornejo floreciente (*Cornus torida* L.) y al arce rojo (*Acer rubrum* L.) bajo un sutil gradiente de humedad, la producción de compuestos fenólicos astringentes aumentó en un 156 y 159% respectivamente, desmostrando que la producción de metabolitos secundarios es mayor bajo condiciones de estrés ambiental.

Los resultados presentados por Ghasemi y col. en 2011, en su estudio de la influencia ambiental sobre la actividad antioxidante y el contenido de compuesto fenólicos en *Juglans regia* L., indicaron que las condiciones geográficas y climáticas da lugar a diferencias tanto en el contenido de compuestos bioactivos como en la actividad de dichos compuestos^[53].

La producción de compuestos fenólicos también se ve incrementada debido a la presencia de metales pesados (estrés por metales pesado), funcionando estos como agentes quelantes e inhabilitando la acción perjudicial de dichos metales según el trabajo de A. Michalak y col., en el 2006^[54].

Con respecto a la especie *Theobroma cacao* L., Djocgoue y col., en el 2007 demostraron que la presencia de patógenos es un factor ambiental que desencadena respuestas biológicas de defensa en la planta durante y después de una infección^[38]. Estos investigadores encontraron una modificación en los perfiles



de compuestos fenólicos al evaluar la resistencia de las plantas de cacao contra el patógeno *Phytophthora megakarya*. Los niveles de carbohidratos y aminoácidos también se vieron afectados por este tipo de interacciones planta-patógeno como observó Omokolo y col., en el 2002, al detectar un aumento de los mismos en clones de cacao resistentes de *Meloidogyne incognita*^[55].

El uso de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa natural por parte de las plantas está suficientemente documentado; y en este sentido, los polifenoles como material de defensa a nivel molecular, tienen una importancia ecológica significativa. Como se mencionó anteriormente, las plantas responden al estrés biótico y abiótico por lo general, a través de cambios anatómicos-morfológicos, fisiológicos, genéticos y químicos. Si bien existen muchos estudios de las respuestas genéticas, fisiológicas y morfoanatómicas de las plantas, las investigaciones sobre los cambios químicos por efecto del estrés son todavía insuficientes.

Adicionalmente en el mundo y en Venezuela en particular, son escasas las investigaciones relacionadas con la ecofisiología y bioquímica del cacao tanto en ecosistemas agrícolas como en hábitats naturales, así como la variabilidad que existe en los genotipos de cacao en cuanto a la plasticidad fisiológica y bioquímica de los mismos en diferentes microclimas. Y a pesar de la considerable variación genética en las características morfológicas y fisiológicas del cacao, se han llevado a cabo pocos estudios tomando en cuenta la interacción entre el genotipo de cacao y el medio ambiente^[56].

Por ejemplo, Galyuon *et al.* (1996), analizaron el efecto de la sombra en numerosos clones de cacao^[57]; mientras que Daymond y Hadley (2004) estudiaron la susceptibilidad de varios genotipos de cacao a la temperatura, encontrando en sus resultados, que la alta variabilidad que existe en el cacao es en respuesta a estrés térmico involucrando temperatura y luz^[56].

En muchas de las zonas productoras de cacao de Venezuela, ocurren períodos cortos o prolongados con disminución en el régimen de precipitación que afectan el crecimiento, el desempeño fotosintético, la EUA (eficiencia en el uso de agua) y la



productividad. En este sentido encontramos el trabajo de Tezara *et al.*, (2009) en relación a las diferencias en la fotosíntesis y eficiencia en el uso del agua en respuesta a la variación en la disponibilidad de agua del suelo en diferentes ambientes de Venezuela^[58]; y los de Pereira *et al.*, (2007), que describe una alta plasticidad fenotípica y/o fisiológica y diferenciación entre diferentes cultivares en temporadas con diferencias en la disponibilidad de agua (sequía y lluvias)^[59].

Teniendo en cuenta, i) el alto valor nutritivo del cacao, así como su capacidad antioxidante debido a su riqueza en polifenoles^[14]; ii) que el genotipo (cacao), el ambiente en el cual crece el genotipo, y la posible interacción genotipo-ambiente pueden influir fuertemente en los niveles de antioxidantes; y iii) la deficiencia en la literatura en relación a qué parámetros determinan el contenido de compuestos fenólicos en las semillas de cacao sin fermentar^[10], se propuso en este trabajo un estudio de la variabilidad en el perfil químico de plantas de cacao y la probable influencia del entorno, teniendo en cuenta tres condiciones ambientales diferentes: bosque seco tropical, bosque semi-húmedo tropical y bosque húmedo tropical. Para este fin se han propuesto los siguientes objetivos.



3. OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar el contenido de compuestos fenólicos, ligninas, aminoácidos y carbohidratos en seis clones de *Theobroma cacao* L. en tres localidades agroclimáticas diferentes del Estado Miranda: Padrón (bosque húmedo tropical), Tesoro (bosque semi-húmedo tropical) y Tacariguita (bosque seco tropical).

Objetivos Específicos:

1. Extraer y cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en seis clones de *Theobroma cacao* L. procedentes de las localidades Padrón, Tesoro y Tacariguita.
2. Extraer y determinar el contenido de ligninas presentes en seis clones de *Theobroma cacao* L. procedentes de las localidades Padrón, Tesoro y Tacariguita.
3. Extraer y determinar el contenido de aminoácidos y carbohidratos presentes presentes en seis clones de *Theobroma cacao* L. procedentes de las localidades Padrón, Tesoro y Tacariguita.



4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Diseño experimental.

Se colectaron entre 6 y 8 hojas al azar de *Theobroma cacao* L. provenientes de seis clones o genotipos de cacao procedentes de tres localidades distintas del estado Miranda (**Tabla 2**).

Tabla 2. Código de los clones de *Theobroma cacao* L. según localidad.

Genotipos	Nombre localidad Tacariguita	Nombre localidad Padrón	Nombre localidad Tesoro
1***	EEM029	EET250	427
2*	EEM011	CUMBO177	421
3*	EEM012	SC10	SC10
4**	EEM010	PENICHE 158	PENICHE 158
5*	EEM028	PV1XIMC11	439
6*	EEM007	OC61XPLA159	443

* Son materiales nacionales; algunos son derivados de cruces entre clones realizados y evaluados hace varios años en Venezuela. (Morillo et al., 2008).

*** (Ecuador). **Turnbull, C.J. and Hadley, P.** *International Cocoa Germplasm Database (ICGD)*. [Online Database]. NYSE Liffe/CRA Ltd./University of Reading, UK. Available: <http://www.icgd.reading.ac.uk> (16th April, 2012).

** (VENEZUELA) **Turnbull, C.J. and Hadley, P.** *International Cocoa Germplasm Database (ICGD)*. [Online Database]. NYSE Liffe/CRA Ltd./University of Reading, UK. Available: <http://www.icgd.reading.ac.uk> (16th April, 2012).

Los mismos fueron cedidos por el Banco de germoplasma del INIA-Miranda.

-BOSQUE SECO TROPICAL (LOCALIDAD TACARIGUITA, municipio Brión):

- Altitud: 52 metros sobre el nivel del mar.
- Fecha de siembra: 2005



- Coordenadas de localización:

N 10°26'37,2''

W 66°12'40,2''

Condición ambiental: temperatura promedio de 27°C y precipitación media de 979mm.

-BOSQUE SEMI-HÚMEDO TROPICAL (LOCALIDAD EL TESORO, municipio Andrés Bello):

- Altitud: 12 metros sobre el nivel del mar.
- Fecha de siembra: 2005
- Coordenadas de localización:

N 10°15'16,7''

W 66°04'12,5''

Condición ambiental: temperatura por encima de 22°C y precipitación media de 1440mm.

-BOSQUE HÚMEDO TROPICAL (LOCALIDAD PADRÓN, municipio Acevedo):

- Altitud: 38 metros sobre el nivel del mar.
- Fecha de siembra: 2005.
- Coordenadas de localización:

N 10°13'14''

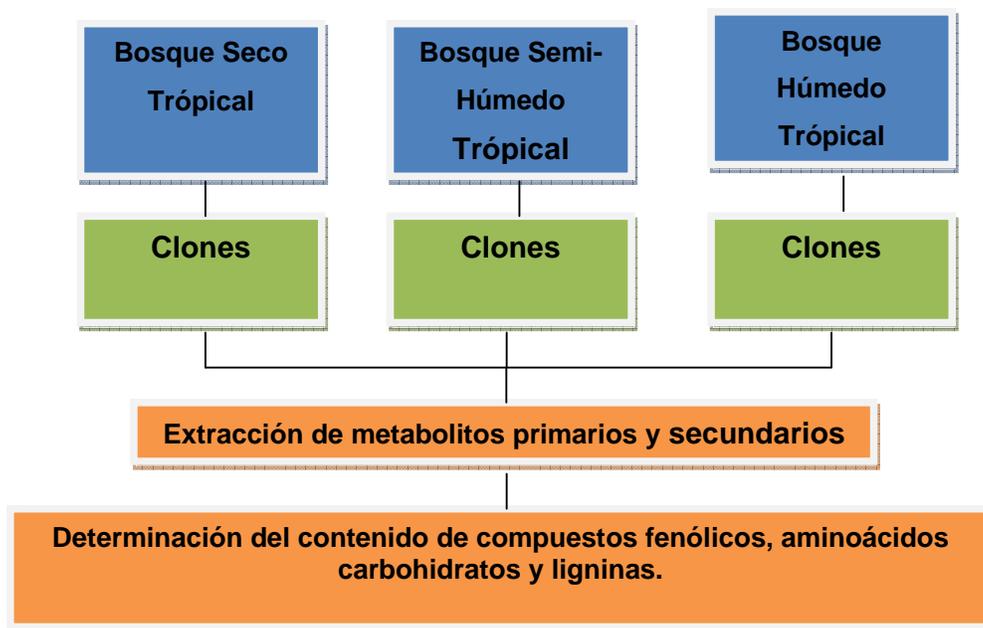
W 66°17'57''

Condición ambiental: temperatura por encima de 18°C y precipitación media de 2000mm.



Al momento de tomar las hojas del árbol se guardaron en un envase con nitrógeno líquido para detener el metabolismo de las mismas. Luego de la colecta, y una vez en el laboratorio, el material vegetal se lavó con agua destilada y se secó con papel absorbente. Posteriormente las muestras se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Figura 5. Procedimiento utilizado en el experimento.



4.2. Materiales y reactivos: Todos los reactivos y solventes utilizados fueron grado analítico.

- Etanol al 80%
- Metanol puro
- NaOH 2M



- HCl 2M
- Ácido Clorogénico
- Fenol
- Tubos de plástico de 1,5 mL.
- Tolueno
- Ninhidrina
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido fosfórico 6M
- Ácido acético glacial
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio

4.3. Equipos:

- Mortero
- Pipetas de 10 mL
- Pipetas Pipetman de 100 y 1000 μ L
- Agitador Vórtex, LABKLASS (modelo XH-2000-1)
- Centrifugadora Eppendorf (modelo g-134d)
- Balanza OHAUS (modelo PIONER PA214)
- Espectrofotómetro TECAN (modelo InfiniteM200, intervalo de barrido: 190-900nm)



4.4. Métodos:

Para cada clon procedente de una determinada localidad se pesaron tres (3) muestras de material foliar macerado haciéndose a partir de ellas tres (3) extracciones, para luego cuantificar los metabolitos según el caso.

4.4.1. Análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos fenólicos presentes en *Theobroma cacao* L. procedentes de tres ambientes distintos.

4.4.1.1. Extracción de fenoles:

Se tomaron 100mg de tejido macerado y se colocaron en un tubo de plástico de 1,5mL. Se adicionaron 500 μ L de metanol, y se agitaron en el vórtex. Luego, se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm y se colectó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento dos veces más utilizando 250 μ L de metanol y se unieron los tres sobrenadantes en un tubo limpio de 1,5mL (**fenoles solubles**), se colocó en un tubo limpio de 1,5mL. Se repitió el procedimiento dos veces más utilizando 250 μ L de metanol, luego se suspendió el pellet en 250 μ L de NaOH 2M y se incubó a 70°C por 16 horas. Finalmente, se neutralizó la solución con 250 μ L de HCl 2M, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min y el sobrenadante obtenido (**fenoles ligados a la pared**), se guardó para su análisis posterior y se recolectó el pellet (**ligninas**).

4.4.1.2. Análisis cualitativo de fenoles por CCF.

El análisis cualitativo de los compuestos fenólicos presentes en los extractos foliares se realizó por medio de una cromatografía en capa fina de gel de sílice. Para esto se colocaron 10 gotas de extracto metanólico a 1,5 cm de la base de la placa de cromatografía de gel de sílice G-25 de 20x20 cm usando capilares de vidrio. Se desarrollaron cromatografías en tres sistemas de solventes: el primero, conformado por una mezcla hexano: acetato de etilo: metanol (60:40:1) se dejó correr durante aproximadamente una hora. Luego de secar, la placa fue analizada en luz blanca, UV de onda larga (365nm) y UV de onda corta (254nm) y posteriormente fue rociada



la placa con una solución al 1% de vainillina en etanol seguida de una solución al 10% en ácido sulfúrico y se calentó a 110°C durante 5 a 10 minutos en una plancha de calentamiento con el fin de observar la aparición de manchas color amarillas ó rojas correspondientes a los compuestos fenólicos o terpenoides presentes.

Para la segunda cromatografía se modificó el sistema de solventes; para ello se empleo una mezcla hexano: acetato de etilo (3:7) y se desarrolló el cromatograma durante 1 hora para luego rociar con anisaldehído y calentar durante 5 minutos.

Por último se realizó una tercera experiencia aumentando la polaridad de la mezcla de solventes, utilizando una mezcla acetato de etilo, ácido acético, acetonitrilo y agua (100:11:11:27) y luego de correrlas se observaron en el UV onda larga(365nm) y onda corta (254nm) para luego ser rociadas con anisaldehído y calentada por 5min a 110°C. Previo a esta tercera cromatografía se extrajo la mayor cantidad de compuestos no polares mayoritarios como la clorofila haciendo pasar los extractos metanólicos por cartuchos de RP18 (Marca Agilent Technologies Accu Bond).

4.4.1.3. Cuantificación de fenoles totales:

Para la cuantificación total de los fenoles, se tomaron 100 µL del extracto etanólico de cada muestra foliar, 900 µL de agua destilada y 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reposar durante 5 minutos, luego se agregaron 600 µL de una solución de NaOH 1M saturada con Na₂CO₃ y se incubó la mezcla por una hora a 25°C para permitir el desarrollo del color y que se disuelva el precipitado (el reactivo de Folin, originalmente amarillo, vira al azul en presencia de compuestos reductores). Finalmente, se registraron las absorbancias en el espectrofotómetro UV a 725 nm, determinando el contenido de fenoles en la muestra en función de una curva de calibración para el ácido clorogénico. Se realizó el procedimiento para los fenoles solubles y los fenoles ligados a la pared de cada muestra, haciendo el análisis por triplicado.



4.4.2 Análisis cualitativo y cuantitativo de carbohidratos no estructurales presentes en *Theobroma cacao* L. .procedente de tres ambientes distintos.

4.4.2.1 Extracción de carbohidratos:

Se tomaron 250mg de tejido macerado y se colocaron en un tubo plástico de 15 mL y se añadieron 2,5 mL de etanol al 80%. Posteriormente, se agitó en el vortex y luego se centrifugó en una centrifugadora Eppendorf a 4000 rpm durante 8 minutos y se colectó el sobrenadante. Se repitió este procedimiento dos veces más y se unieron los sobrenadantes en tubo plástico de 15 ml.

4.4.2.2 Cuantificación de carbohidratos:

Se colocaron 50µL de la solución del analito (extracto etanólico) en un vial limpio y se dejó evaporar a sequedad a temperatura ambiente, luego se colocó el blanco (agua destilada) y la solución estándar (glucosa) en tubos de ensayo, se agregaron a cada uno 0,5mL de solución fenol al 5% y 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado. La solución resultante se agitó en el vortex y se dejó reposar de 10 a 15 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 492 nm en celdas colorimétricas de cuarzo. La concentración total se midió con respecto a una curva estándar (método Dubois^[61]), preparando patrones de glucosa de 10 a 100ppm los ensayos fueron realizados por triplicado.

4.4.2.3 Análisis cualitativo de carbohidratos por CCF:

Para llevar a cabo el análisis por cromatografía de capa fina se utilizaron las siguientes condiciones:

- Eluyente (100ml): Metanol : Acetato de Etilo : Ácido Acético : Agua (1:6:1,5:1)
- Revelador: 50% de difenilamina en anilina (1ml), más 50 ml de acetona, más 7,5 ml de Ácido fosfórico. Luego de ser rociada la placa se calentó a 100°C por 5min.
- Patrones: Sacarosa, Glucosa y Fructosa, 50 mg en 1 ml de agua.



4.4.3. Análisis cualitativo y cuantitativo de aminoácidos presentes en *Theobroma cacao* L. procedente de tres ambientes distintos.

4.4.3.1. Cuantificación de aminoácidos (prolina libre).

Para la cuantificación de aminoácidos (prolina libre) se tomaron 500µL del extracto descrito anteriormente para los carbohidratos totales, se adicionaron 500µL de reactivo de ninhidrina (ninhidrina anhidra, ácido acético glacial y ácido fosfórico 6M) y 500µL de HAc glacial. Se agitó y se puso en un baño maría a 100°C por 1h. Se agregó 1 mL de tolueno y se agitó. Se leyó la absorbancia de la fase orgánica a 520 nm utilizando el tolueno como blanco. El contenido de prolina libre se expresó en µg/g de masa fresca referido a una curva patrón de prolina.

4.4.3.2. Análisis cualitativo de aminoácidos por CCF.

Para llevar a cabo el análisis por cromatografía de capa fina se utilizaron las siguientes condiciones:

- Eluyente (100ml): Butanol : Ácido Acético : Agua (4:1:1)
- Revelador: Solución 1% Ninhidrina Etanólica. Luego de ser rociada la placa se calentó a 100°C por 5min.
- Patrones: D-Prolina, D-Serina, D-Asparagina, DL-Isoleucina, Glicina y Cisteína, 10 mg en 1 ml de agua.

4.4.4 Análisis cualitativo y cuantitativo de ligninas presentes en *Theobroma cacao* L. procedente de tres ambientes distintos.

4.4.4.1. Extracción de ligninas.

Se tomó cada residuo o pellet proveniente de la extracción de fenoles ligados a la pared y se pasaron a tubos falcon de 15mL. Luego se adicionaron 7mL de agua destilada y posteriormente se agitó ajustando a pH 7 con NaOH/HCl a un volumen final de 10mL; se centrifugó a 4000rpm y se reservó el pellet. Este último se trató



con 10mL de una solución de NaOH 0,1M, se agitó en vortex y luego se centrifugó a 4000rpm. Se separó el pellet del extracto básico y este último se guardó a -20°C para su posterior determinación.

4.4.4.2. Cuantificación de ligninas.

Para la cuantificación, se tomaron 2 alícuotas de 1mL de cada extracto básico a la primera se le adicionó 4mL de NaOH 0.1M (pH 12) y a la segunda 4mL de buffer fosfato (pH 7). Se determinó la absorbancia a 280nm de cada extracto a pH 12 contra los de pH 7 (blanco) a 280nm. Y se preparó una curva de calibración con lignina comercial para expresar los resultados en µg de lignina /mg de material de partida.

4.5. Análisis estadístico.

Para una mejor interpretación de los datos obtenidos en cada cuantificación de metabolitos realizada se aplicó un análisis de varianzas (ANOVA) y un análisis de comparación de medias, prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC). El programa estadístico para realizar el ANOVA fue el PAST 2008^[63] y el programa para realizar la DGC fue el INFostat 2011^[64].



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se pretende que este trabajo se convierta en la base de futuras investigaciones encaminadas a determinar la interacción genotipo (G) de cacao - ambiente (A) en el país con vistas a entender las respuestas de los diferentes cultivares a varias condiciones ambientales, relacionar esto con el rendimiento y resistencia a enfermedades y así poder tener recomendaciones de uso de cultivares de cacao para las diferentes regiones del país.

5.1 Cuantificación de Compuesto fenólicos.

5.1.1 Cuantificación de compuestos fenólicos solubles.

Para realizar la cuantificación de compuesto fenólicos solubles, se realizó una extracción con metanol en tres pasos hasta llegar a un volumen final de 1mL. Al tratar el pellet o residuo con una solución de hidróxido de sodio y luego suministrar temperatura, se favoreció una hidrólisis básica rompiéndose las paredes celulares y liberando los compuestos fenólicos ocluidos en la pared celular (fenoles ligados)^[24]. Se cuantificaron por separado ambos extractos preparando una curva de calibración externa con el ácido clorogénico; compuesto fenólico presente en *Theobroma cacao* L.^[38]. Se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu el cual, en presencia de compuestos fenólicos, forma complejos de tungsteno y molibdeno que absorben a 725nm^[64].

En el **gráfico 7** (ver anexos) se muestra la ecuación de la recta obtenida por ajuste de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación lineal R^2 observándose que existe una correlación lineal y una dependencia entre las dos variables concentración-absorbancia, cumpliéndose así la ley de Beer^[65].

Luego del tratamiento de la data, se obtuvieron los siguientes valores de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de fenoles solubles para cada clon en su respectivo ambiente:



Tabla 3. Concentración de fenoles solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$) contenidos en el material foliar de distintos clones en las tres localidades estudiadas.

Clon	Localidad Padrón*	CV %	Localidad Tesoro*	CV %	Localidad Tacariguita*	CV %
EEM 028	17,4 \pm 0,5 (A)	2,9	8,2 \pm 0,4 (B)	4,8	10,8 \pm 0,3 (B)	2,8
EEM 029	14,6 \pm 0,7 (A)	4,8	9,5 \pm 0,3 (A)	3,2	6,0 \pm 0,1 (C)	2
EEM 012	11,9 \pm 0,3 (B)	2,5	7,1 \pm 0,3 (B)	4,2	7,1 \pm 0,5 (C)	7
EEM 010	9,3 \pm 0,4 (C)	4,3	6,3 \pm 0,1 (B)	2	14,0 \pm 0,6 (A)	4,3
EEM 007	9,02 \pm 0,01(C)	0,1	8,1 \pm 0,5 (B)	6,2	12,9 \pm 0,5 (A)	3,9
EEM 011	8,5 \pm 0,5 (C)	5,9	7,4 \pm 0,4 (B)	5,4	14,5 \pm 0,2 (A)	1,3

Se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu a 25°C y oscuridad; las absorbancias se midieron a 725nm. Para cada clon se realizaron tres (3) replicas (alícuota 100 μL) y cada una fue medida tres (3) veces. **Los valores representan el promedio de cada tratamiento \pm el error estándar y el coeficiente de variación (CV), (Test DGC, $p \leq 0.05$).** Medias de una misma localidad con una letra común no son significativamente diferentes.

* **Localidad Padrón** bosque húmedo, **Localidad Tesoro** bosque semi-húmedo, **Localidad Tacariguita** Bosque Seco; todas ubicadas en el Estado Miranda.

Como puede observarse en la **tabla 3** para cada clon existen diferencias en las cantidades de compuestos fenólicos solubles según su procedencia, ya sea de Padrón, Tesoro ó Tacariguita.

Es así como para los clones **EEM029**, **EEM012** y **EEM028** de Padrón se observa una mayor producción de compuestos fenólicos solubles mientras que en Tacariguita la producción de estos compuestos es 58,6%, 40,3% y 37,9% menor que en Padrón respectivamente. Los clones provenientes de Tesoro muestran valores intermedios o cercanos a los valores observados en Padrón. Si analizamos la data hasta este punto, se evidencia que la producción de compuestos fenólicos se ve estimulada por la mayor cantidad de agua presente en Padrón^[47]. En contraste a los clones ya mencionados tenemos los valores observados para los clones **EEM011**, **EEM010** y **EEM007**, con mayor producción de compuestos fenólicos en Tacariguita (41,4%, 33,6% y 30,2% respectivamente) que en Padrón; mientras que la producción de fenoles en los clones procedentes de Tesoro fue la menor de las tres



localidades, haciendo que la producción de polifenoles sea mayor en déficit hídrico. Los resultados demuestran la plasticidad metabólica de *Theobroma cacao* L. y la adaptabilidad al medio en el que se desarrolla^[58].

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para saber si estadísticamente hay diferencias en la producción de compuestos fenólicos en las tres localidades. Para llevar a cabo el análisis se plantearon dos hipótesis:

- **Hipótesis nula** ($H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3$): en la cual se considera que todas las medidas son iguales.
- **Hipótesis alternativa** ($H_1: \mu_1\neq\mu_2$): en la cual se considera que al menos una de las medidas es distinta.

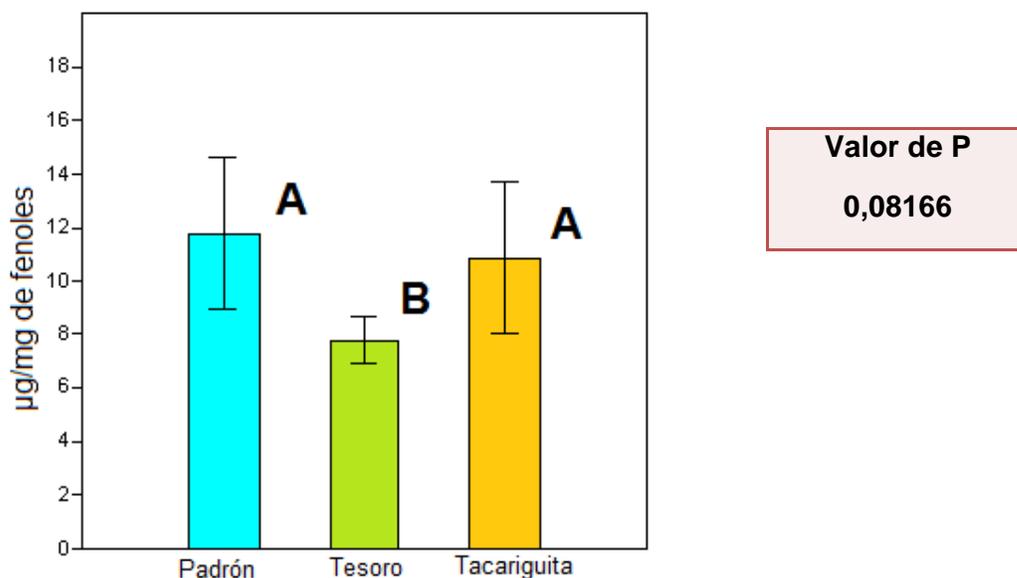
Se tomó un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0,05$) comúnmente usado para análisis de este tipo, tomando en cuenta que si el valor calculado **P** (probabilidad de que H_0 sea cierta):

- **$P>\alpha$** se acepta la hipótesis nula H_0 .
- **$P<\alpha$** se rechaza la hipótesis nula H_0 y se acepta la hipótesis alternativa H_1 .

Se introdujeron los datos en el programa estadístico PAST y este arrojó el siguiente resultado:



Gráfica 1. Variación en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de los fenoles solubles aislados de clones de *Theobroma cacao* L. de las tres localidades.



Los valores representan las medias de cada tratamiento \pm el error estándar (ANOVA, Test DGC $p \leq 0.05$). Medias con letras similares no son significativamente diferentes.

Como el valor de **P** es mayor que el nivel de significancia α se acepta la hipótesis nula que dice que las medidas son iguales y no existen diferencias estadísticas entre la producción de compuestos fenólicos por parte de los clones en las tres localidades estudiadas. En el gráfico de barras se aprecian las medias de las cantidades de fenoles solubles, que para el caso de Padrón y Tacariguita son similares, al igual que para Tesoro y Tacariguita, con valores en común para los intervalos de dispersión de datos (error estándar), indicando que no existen diferencias estadísticas. Un comportamiento diferente se encontró al analizar la concentración de fenoles en Padrón con respecto a Tesoro pues en este caso sí se encontraron diferencias significativas sin valores en común para los intervalos de dispersión de datos.



5.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos ligados a la pared celular.

Se realizó la cuantificación de los compuesto fenólicos ligados a la pared celular utilizando el método descrito para los fenoles solubles. En este caso luego del tratamiento de la data, se obtuvieron los siguientes valores de $\mu\text{g}/\text{mg}$ fenoles solubles para cada clon en su respectiva área:

Tabla 4. Concentración de fenoles ligados ($\mu\text{g}/\text{mg}$) a la pared celular contenidos en el material foliar de distintos clones en las tres localidades estudiadas.

Clon	Localidad Padrón*	CV %	Localidad Tesoro*	CV %	Localidad Tacariguita*	CV %
EEM 029	7,0 \pm 0,1 (A)	1,4	5,1 \pm 0,2 (C)	3,9	3,6 \pm 0,1 (C)	2,8
EEM 011	5,1 \pm 0,2 (B)	3,9	5,0 \pm 0,1 (C)	2	6,1 \pm 0,1 (A)	1,6
EEM 012	5,8 \pm 0,2 (A)	3,4	5,1 \pm 0,2 (C)	3,9	4,5 \pm 0,2 (B)	4,4
EEM 010	5,4 \pm 0,1 (B)	1,9	6,0 \pm 0,2 (B)	3,3	6,1 \pm 0,2 (A)	3,3
EEM 028	6,4 \pm 0,1 (A)	1,6	6,8 \pm 0,2 (A)	2,9	6,3 \pm 0,1 (A)	1,6
EEM 007	5,6 \pm 0,3 (B)	5,3	5,8 \pm 0,2 (B)	3,4	3,7 \pm 0,2 (C)	5,4

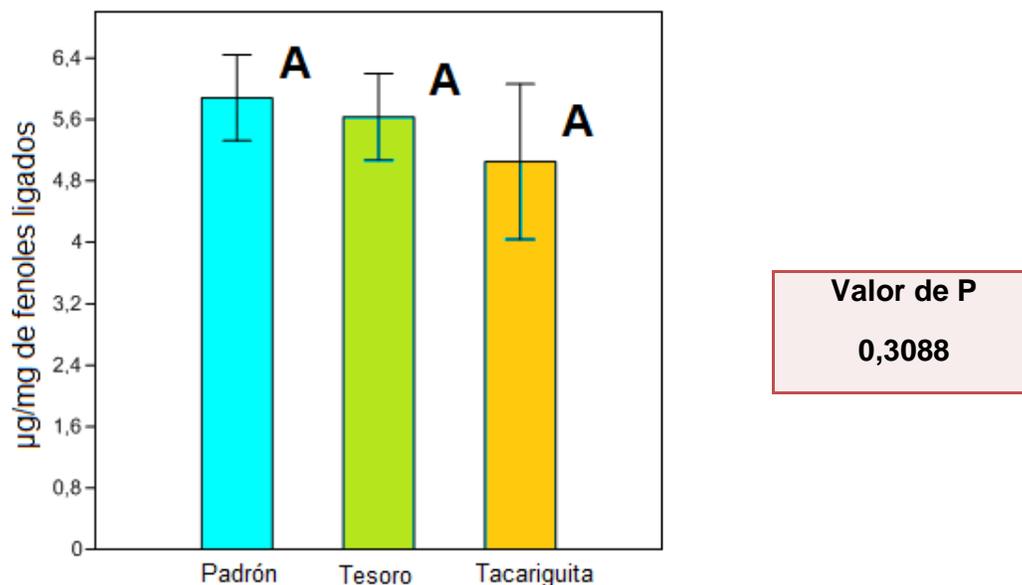
Se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu a 25°C y oscuridad; las absorbancias se midieron a 725nm. Para cada clon se realizaron tres (3) replicas (alícuota 100 μL) y cada una fue medida tres (3) veces. **Los valores representan el promedio de cada tratamiento \pm el error estándar y el coeficiente de variación (CV), (Test DGC, $p \leq 0.05$).** Medias de una misma localidad con una letra común no son significativamente diferentes.

* **Localidad Padrón** bosque húmedo, **Localidad Tesoro** bosque semi-húmedo, **Localidad Tacariguita** Bosque Seco; todas ubicadas en el Estado Miranda.

Como se puede observar en la tabla anterior se obtienen pequeñas diferencias entre las cantidades de compuestos fenólicos ligados a la pared para cada clon según la localidad de procedencia, pero la cercanía entre los valores reportados indica que no son diferencias determinantes y no se pueden atribuir a factores ambientales o genéticos ya que son aleatorias. En el caso de los clones **EEM029**, **EEM012** y **EEM007** las cantidades de polifenoles ligados es ligeramente menor en Tacariguita que en Padrón, de igual forma que con los fenoles solubles se realizó un ANOVA para observar el comportamiento estadístico, obteniendo el siguiente resultado:



Gráfica 2. Variación en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de los fenoles ligados aislados de clones de *Theobroma cacao* L. de tres localidades.



Los valores representan las medias de cada tratamiento \pm el error estándar (ANOVA, Test DGC $p \leq 0.05$). Medias con letras similares no son significativamente diferentes.

En el gráfico anterior se aprecia que los valores de las medias son muy parecidos entre las localidades al igual que los intervalos de dispersión de datos, haciendo que no existan diferencias estadísticas en la producción de compuestos fenólicos ligados en los clones de cada localidad.

5.1.3 Cuantificación de compuestos fenólicos totales.

La concentración de fenoles totales (valores obtenidos de la suma algebraica de la cantidad de fenoles solubles y fenoles ligados a la pared de cada clon) se muestra en la **tabla 5**.

Los compuestos fenólicos son considerados como los productos derivados del metabolismo secundario de mayor influencia y amplia distribución en el reino de las plantas, y desempeñan importantes funciones fisiológicas y ecológicas involucradas



en la resistencia a diferentes tipos de estrés^[66]. En condiciones estresantes, el incremento en el contenido de ácidos fenólicos puede estar ligado a la lignificación de las paredes celulares y en parte, a la síntesis de ciertos aminoácidos que mantienen el ajuste osmótico en las células^[67].

En *T. cacao*, las células polifenólicas están ubicadas en la epidermis y subepidermis de las hojas, raíces y en el mesófilo de los cotiledones de las semillas; estas juegan un papel importante en la regulación del crecimiento de la plantas, en su desarrollo y en su interacción con otros organismos así como en la defensa ante estrés de varios tipos, y determinan a futuro, junto con otros elementos de reserva, el sabor y color del chocolate^[68]. A pesar de que aún es escasa la información del contenido y composición en compuestos fenólicos de las semillas de cacao, la información disponible sobre los mismos en las hojas y raíces es prácticamente nula.

Los fenoles totales se determinaron por la sumatoria de los fenoles solubles y los ligados a la pared.

Tabla 5. Concentración de fenoles totales** ($\mu\text{g}/\text{mg}$) contenidos en material foliar de distintos clones de las tres localidades estudiadas.

Clon	Localidad Padrón	CV %	Localidad Tesoro	CV %	Localidad Tacariguita	CV %
EEM 029	21,6 \pm 0,7 (A)	3,2	14,6 \pm 0,4 (A)	2,7	9,6 \pm 0,1 (D)	1
EEM 011	13,6 \pm 0,5 (C)	3,7	12,4 \pm 0,4 (B)	3,2	20,6 \pm 0,1 (A)	0,5
EEM 012	17,7 \pm 0,4 (B)	2,3	12,2 \pm 0,4 (B)	3,3	11,6 \pm 0,5 (C)	4,3
EEM 010	14,7 \pm 0,4 (C)	2,7	12,3 \pm 0,4 (B)	3,3	20,1 \pm 0,6 (A)	3
EEM 028	23,8 \pm 0,5 (A)	2,1	15,0 \pm 0,4 (A)	2,7	17,1 \pm 0,3 (B)	1,8
EEM 007	14,6 \pm 0,3 (C)	2,1	13,9 \pm 0,5 (B)	3,6	16,6 \pm 0,5 (B)	3

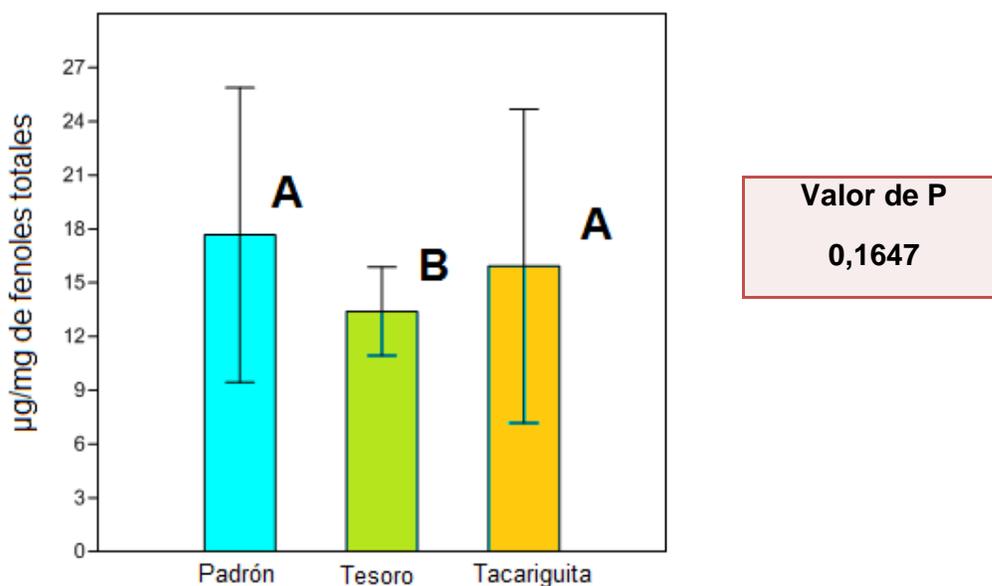
** Valores obtenidos de la suma algebraica de la cantidad de fenoles solubles y fenoles ligados obtenidos de cada clon. Los valores representan el promedio de cada tratamiento \pm el error estándar y el coeficiente de variación (CV), (Test DGC, $p \leq 0.05$). Medias de una misma localidad con una letra común no son significativamente diferentes.

* **Localidad Padrón** bosque húmedo, **Localidad Tesoro** bosque semi-húmedo, **Localidad Tacariguita** Bosque Seco; todas ubicadas en el Estado Miranda.



Los resultados observados en la tabla anterior siguen el mismo patrón observado en la **tabla 3** (concentración compuestos fenólicos solubles) donde los clones **EEM029**, **EEM012** y **EEM028** presentan concentraciones mayores en Padrón que el Tacariguita mientras que los clones **EEM011**, **EEM010** y **EEM007** presentan un comportamiento contrario. De igual manera que en apartados anteriores se realizó un ANOVA de los datos presentados para fenoles totales obteniendo el siguiente resultado:

Gráfica 3. Variación en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de los fenoles totales aislados de distintos clones de las tres localidades estudiadas.



Los valores representan las medias de cada tratamiento \pm el error estándar (ANOVA, Test DGC $p \leq 0.05$). Medias con letras similares no son significativamente diferentes.

Los resultados encontrados no aportan información concluyente acerca de la influencia del medio sobre la producción de compuestos fenólicos debido a la distribución de los datos, haciendo que parezca que la producción de fenoles en los clones de cacao estudiados sea controlada por factores genéticos más que ambientales.



Existen diferencia en el contenido y composición de polifenoles en semillas de cacao (sin fermentar y fermentadas) Forastero, Trinitario y Criollo en función de la influencia del genotipo y del sitio geográfico, encontrándose que hay diferencias tipo-específicas en los compuestos fenólicos en las semillas de cacao sin fermentar; describiéndose además, que el contenido de nutrientes en el suelo parece influir en la cantidad y la composición de polifenoles en las semillas de cacao^[70], resultados que difieren de los descritos por Graziani *et al.*^[69]. Así mismo Djocgoue *et al.*, (2007) demostraron que ante la infección de hojas de cacao con el patógeno *P. megakarya*, el contenido de fenoles aumentó, ocurriendo una modificación en los perfiles fenólicos, indicativo del papel que desempeñan estos compuestos en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades^[38].

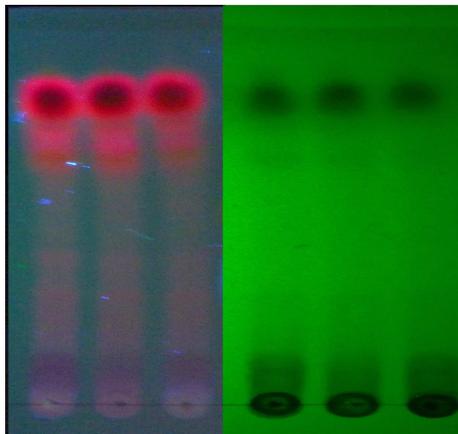
A futuro, es de vital importancia diferenciar los tipos de fenoles presentes en cada uno de estos clones en los 3 ambientes, puesto que se sabe, que por ejemplo, no todos los fenoles aumentan o disminuyen frente a un déficit hídrico. Al parecer, los de tipo no flavonoides (fenilpropanoides derivados de ácido cinámico, ferúlico etc.) serían más sensibles al déficit hídrico^[71].

5.1.4 Análisis cualitativo de fenoles por CCF.

El análisis cualitativo de los compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos foliares se realizó por medio de cromatografía de capa fina utilizando tres sistemas de solventes. Para el análisis inicial se utilizó el sistema de solventes hexano: acetato de etilo: metanol (60:40:10) y como muestra el clon **EEM011** de cada localidad para llevar a cabo una prueba del comportamiento del extracto bajo esta mezcla, obteniéndose el siguiente resultado:



Figura 6. Cromatografía de Capa Fina de los extractos metanólicos del clon EEM011 procedente de cada uno de las localidades estudiadas.

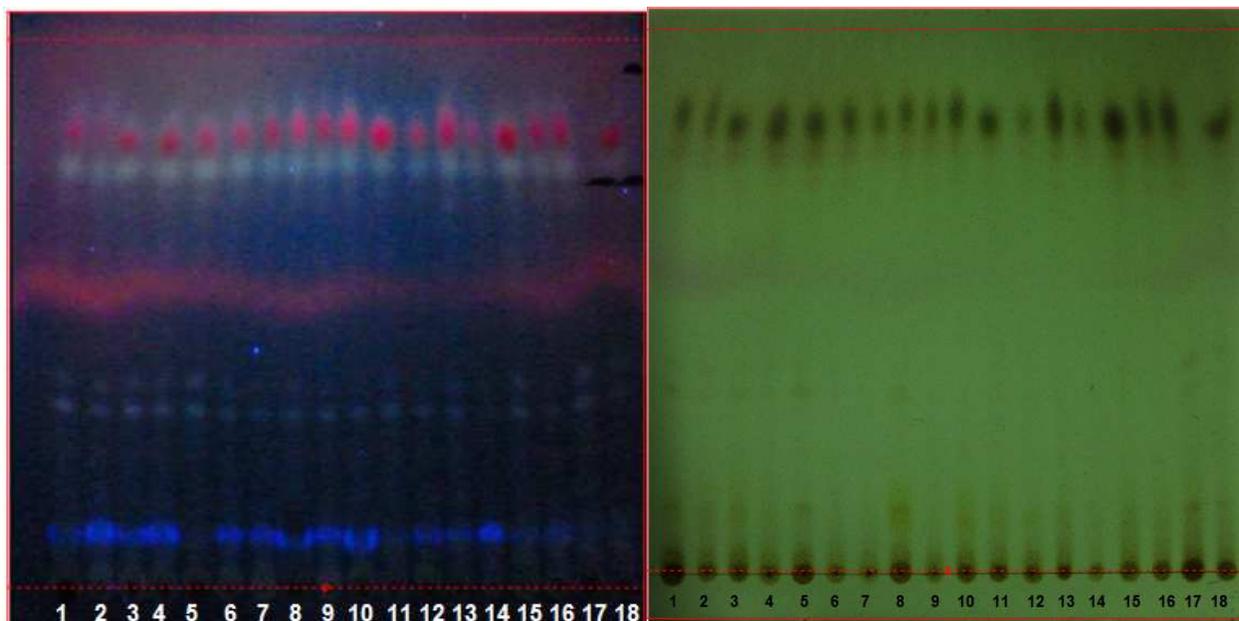


Sistema de solventes hexano: acetato de etilo: metanol (60:40:1); foto de la derecha tomada bajo luz UV de onda larga (365nm) y foto de la izquierda tomada bajo luz UV de onda corta (254nm). Orden de los extractos sembrados de izquierda a derecha: EEM011 Padrón (bosque húmedo), EEM011 Tacariguita (bosque seco) y EEM011 Tesoro (bosque semi-húmedo).

Como se puede observar en la figura anterior cerca del frente de solventes se encuentran una serie de manchas rojizas bajo luz UV 365nm, asociada a la presencia de clorofilas. Se pueden observar también, coloraciones rosadas y moradas asociadas a compuestos conjugados del tipo flavonoidal, cumarinas, antracenos, etc. Con el fin de detectar más claramente los derivados fenólicos presentes se empleó la mezcla de solventes hexano: acetato de etilo (3:7) y se utilizaron todos los clones procedentes de cada localidad (18 extractos en total), se reveló con solución etanólica de anisaldehído, que es un revelador universal que permite la detección de los compuestos fenólicos dando una coloración rosada ó roja^[72].



Figura 7. Cromatografía de Capa Fina de los extractos metanólicos de los clones de *Theobroma cacao* L. estudiados.

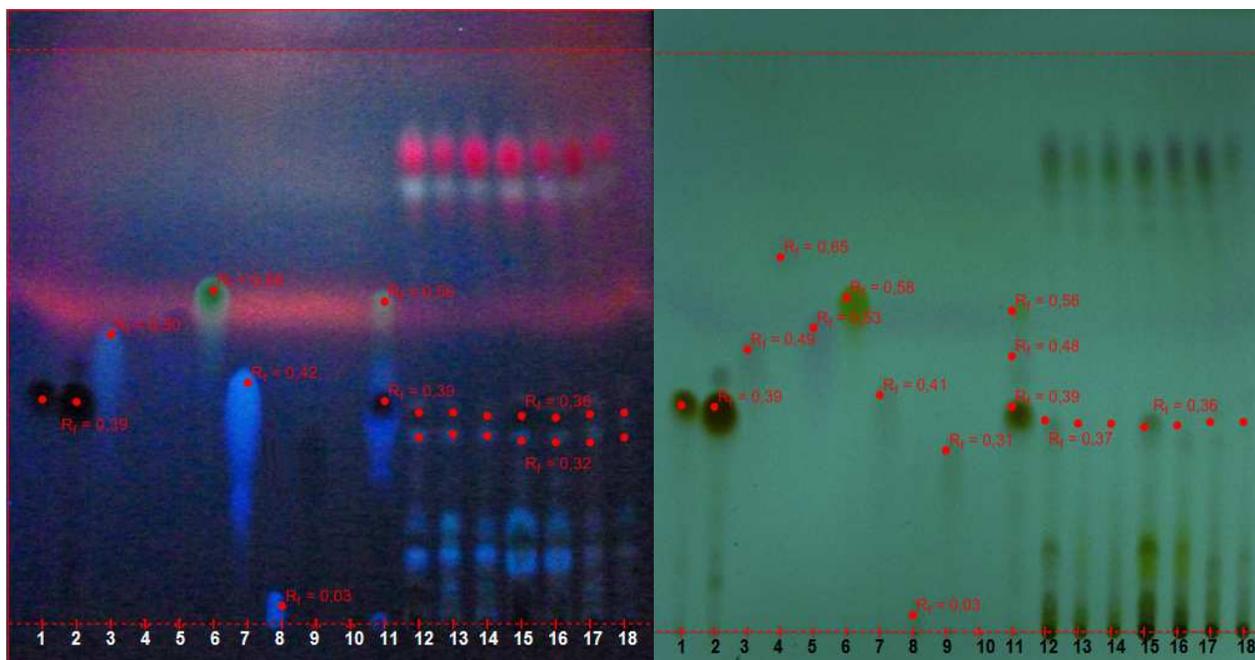


Sistema de solventes hexano: acetato de etilo (3:7), placa revelada con anisaldehído etanólico y vista bajo luz UV (foto de la derecha) de onda larga (365nm); foto de la izquierda tomada bajo luz blanca. Padrón (bosque húmedo tropical): 1.EEM029, 2.EEM011, 3.EEM012, 4.EEM010, 5.EEM028, 6.EEM007; Tacariguaita (bosque seco tropical): 7.EEM029, 8.EEM011, 9.EEM012, 10.EEM010, 11.EEM028, 12.EEM007; Tesoro (bosque semi-húmedo tropical): 13.EEM029, 14.EEM011, 15.EEM012, 16.EEM010, 17.EEM028, 18.EEM007.

Al observar la figura anterior se puede inferir que todos los clones poseen los mismos metabolitos, pero en cantidades distintas, esto explica el porqué unas manchas son más notorias que otras. El efecto de las condiciones ambientales en este experimento no afectó de manera tal que se produjera o se dejara de producir un metabolito en específico pero sí en las concentraciones de los fenoles presentes. Para corroborarlo, se tomaron clones al azar de cada localidad (siete clones, Padrón (bosque húmedo tropical): 12. EEM029, 13.EEM012, 14.EEM010; Tacariguaita (bosque seco tropical): 15.EEM011, 16.EEM010; Tesoro (bosque semi-húmedo tropical): 17.EEM012, 18. EEM028) para compararlos frente a patrones de compuestos fenólicos encontrados en el laboratorio y utilizando la misma mezcla de solventes descrita anteriormente, obteniéndose el siguiente resultado:



Figura 8. Cromatografía de Capa Fina de los extractos metanólicos de *Theobroma cacao* L. procedentes de las localidades estudiadas.



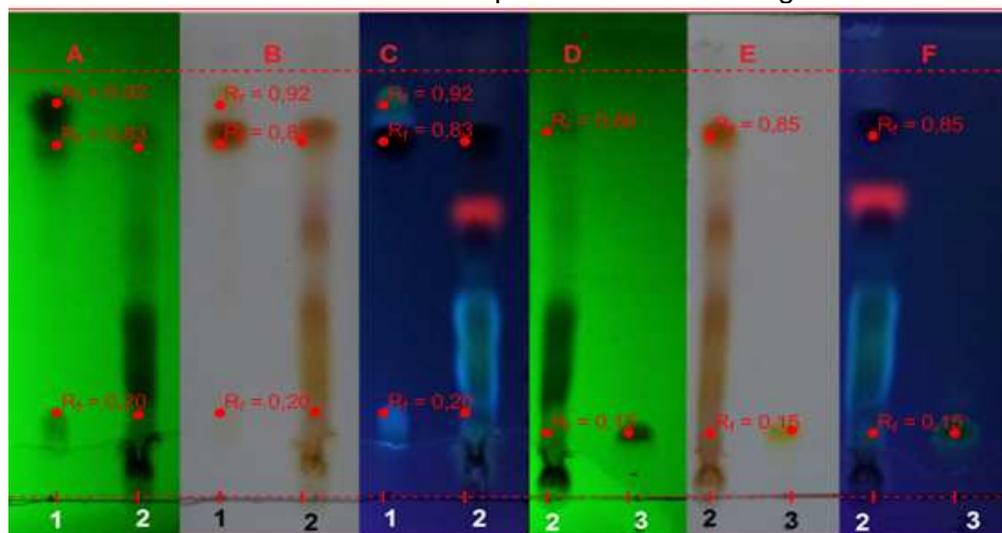
Sistema de solventes hexano: acetato de etilo (3:7), placa revelada con anisaldehído etanólico y vista bajo luz UV (foto de la derecha) de onda larga (365nm) después de revelar; foto de la izquierda tomada bajo luz blanca. Patrones: **1.**Catequina, **2.**Epicatequina, **3.**Ácido ferúlico, **4.**Vainillina, **5.** Ácido Cumarico, **6.** Quercetina, **7.** Ácido cafeico, **8.** Ácido clorogénico, **9.** Ácido gálico, **10.**Ácido transcinámico, **11.** Mezcla de patrones; clones de Padrón (bosque húmedo tropical): **12.** EEM029, **13.**EEM012, **14.**EEM010; clones de Tacariguita (bosque seco tropical): **15.**EEM011, **16.**EEM010; clones de Tesoro (bosque semi-húmedo tropical): **17.**EEM012, **18.** EEM028.

En la figura anterior se evidencia en todos los clones estudiados la presencia de unas manchas café rojizas con R_f : 0,39 asociadas a la presencia de catequinas luego de rociar la placa con reactivo de anisaldehído. M. Rusconi *et. al* (2009) indicaron que las catequinas representan un 37% de la cantidad total de polifenoles presentes en semillas de *Theobroma cacao* L. mientras que los fenoles del tipo fenilpropanoides de estructuras sencillas como el ácido cafeico y cumárico son minoritarios^[73]. En los clones aquí analizados se observan manchas que corresponden a compuestos de mayor tamaño y polaridad que los patrones de



compuestos fenólicos disponibles en el laboratorio. Esto parece indicar la presencia de derivados fenólicos glicosilados. Con el fin de analizar la posible presencia de compuestos más polares se realizó un tercer análisis por CCF aumentando la polaridad e incluyendo entre los patrones el flavonoide glicosilado rutina, a su vez se purificó el extracto metanólico del clon EEM011 procedente de Padrón (clon que presentó las manchas más intensas) con cartucho de RP18 con el fin de retirar las clorofilas. Luego de esto se obtuvieron los siguientes resultados:

Figura 9. Cromatografía de Capa Fina del extracto metanólico del clon EEM011 de *Theobroma cacao* L. procedente de Tacarigua.



Sistema de solventes acetato de etilo: ácido acético: acetonitrilo: agua (100:11:11:27), placa revelada con anisaldehído etanólico; fotos **A** y **D** UV 254nm antes de revelar, fotos **B** y **E** Vis después de revelar, fotos **D** y **F** UV 365nm después de revelar. **1.** Mezcla de patrones utilizada en **figura 8**; **2.** EEM011, clon bosque seco tropical y **3.** Patrón de rutina.

En la figura anterior se evidencia la presencia de ácido clorogénico con un Rf de 0,20 y rutina con un Rf de 0,15, además de varias manchas asociadas a compuestos fenólicos. En el clon EEM011 se confirma de manera clara la presencia de catequinas con un Rf de 0,83; mientras que la quercetina de color verde en la foto **C** no se aprecia de forma concluyente, lo cual se deba tal vez, a la baja concentración



de la misma. Capriles De Reyes *et. al* en 1968 analizaron el contenido de polifenoles en dos variedades de *Theobroma cacao* L. encontrando al ácido clorogénico y las catequinas como mayoritarios además de relacionar su concentraciones con la resistencia a *Coleoptera cerambycidae*^[74].

5.2 Cuantificación de Carbohidratos no estructurales.

Para la extracción de los carbohidratos no estructurales, se utilizó una solución de etanol al 80%, realizándose la extracción tres veces hasta alcanzar un volumen final de 7,5ml para asegurar así la extracción de la mayor cantidad de carbohidratos y prolina libre. Cabe destacar que este extracto se usó también para la cuantificación de prolina libre.

Se utilizó el método de Dubois^[61] para cuantificar los carbohidratos no estructurales el cual se basa en la formación de un complejo entre los derivados furfurales de los azúcares y el fenol, que absorbe en el visible siendo su máximo de absorción a los 492nm. Siguiendo el método descrito en la parte experimental, se preparó una curva de calibración externa para la D-glucosa, usando patrones de 10 a 100ppm aproximadamente, obteniéndose la **gráfica 9** de regresión lineal (ver anexos).

Luego del tratamiento de la data, se obtuvieron los siguientes valores de $\mu\text{g}/\text{mg}$ de masa fresca de carbohidratos no estructurales para cada clon en su respectiva localidad:



Tabla 6. Concentración de carbohidratos solubles ($\mu\text{g}/\text{mg}$) contenidos en material foliar de los distintos clones en las tres localidades estudiadas.

Clon	Localidad Padrón*	CV %	Localidad Tesoro*	CV %	Localidad Tacariguita*	CV %
EEM 029	44,5 \pm 0,8 (B)	1,8	34,8 \pm 0,3 (A)	0,9	36 \pm 1 (D)	2,8
EEM 011	46,3 \pm 0,4 (B)	0,9	23,6 \pm 0,5 (D)	2,1	57 \pm 1 (B)	1,8
EEM 012	43,2 \pm 0,6 (B)	1,3	30,9 \pm 0,9 (B)	2,9	49,5 \pm 0,6 (C)	1,2
EEM 010	30,6 \pm 0,9 (C)	2,9	29 \pm 1 (B)	3,4	56 \pm 1 (B)	1,8
EEM 028	50 \pm 2 (A)	4	27,2 \pm 0,5 (C)	1,8	56,0 \pm 0,2 (B)	0,4
EEM 007	29,8 \pm 0,6 (C)	2	27,2 \pm 0,1 (C)	0,4	59 \pm 2 (A)	3,4

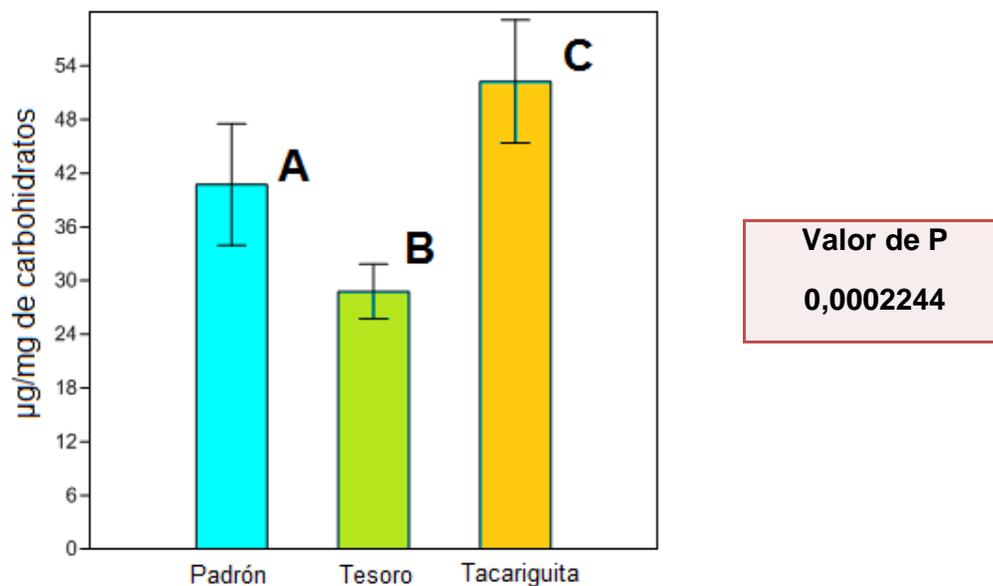
Valores obtenidos siguiendo el método de Dubois, midiendo el complejo de color amarillo a 492nm; obtenido al hacer reaccionar 50 μL + 500 μL de fenol acuoso al 5%P/P y 2500 μL de ácido sulfúrico concentrado. Para cada clon se realizaron tres (3) extracciones y para cada una se realizaron tres (3) medidas. **Los valores representan el promedio de cada tratamiento \pm el error estándar y el coeficiente de variación (CV), (Test DGC, $p \leq 0.05$).** Medias de una misma localidad con una letra común no son significativamente diferentes.

* **Localidad Padrón** bosque húmedo, **Localidad Tesoro** bosque semi-húmedo, **Localidad Tacariguita** Bosque Seco; todas ubicadas en el Estado Miranda.

De lo resultados de la tabla 6 podemos deducir que en todos los casos, excepto en **EEM029**, se observa la mayor cantidad de carbohidratos no estructurales acumulados por clones de Tacariguita mientras que los clones de Tesoro acumularon menor cantidad de estos carbohidratos y los clones de Padrón acumularon una cantidad intermedia. Para demostrar lo descrito se realizó un ANOVA de una vía, obteniéndose el siguiente resultado:



Gráfica 4. Variación en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de los carbohidratos solubles aislados de clones de *Theobroma cacao* L. de las tres localidades.



Los valores representan las medias de cada tratamiento \pm el error estándar (ANOVA, Test DGC $p \leq 0.05$). Medias con letras similares no son significativamente diferentes.

En la **gráfica 4** se muestra la producción de carbohidratos no estructurales y se observa al menos diferencias en una de las localidades. También se puede apreciar la diferencia marcada de Tesoro con respecto a las otras zonas, en el cual todos los clones acumularon la menor cantidad de carbohidratos no estructurales.

El valor de **P** arrojado por el ANOVA es menor que α , haciendo que se rechace la hipótesis nula y se acepte la hipótesis alternativa, la cual nos dice que la producción de carbohidratos no estructurales es diferente al menos en una para las tres localidades. Observando el gráfico se puede apreciar la diferencia marcada del bosque semi-húmedo tropical con respecto a las otras zonas, en el cual todos los clones acumularon la menor cantidad de carbohidratos no estructurales.



La producción de carbohidratos se debe al proceso de la fotosíntesis que depende de tres factores: concentración de dióxido de carbono en el aire, cantidad de luz y humedad. Se considera que la concentración de CO₂ en el aire es la misma en las tres zonas, dejando expuestas las otras dos variables. Sabiendo esto, las diferencias entre los clones procedentes de las tres zonas, se puede atribuir a la plasticidad metabólica de *Theobroma cacao* L. para adaptarse al medio en el cual se desarrolla^[50] por ello se puede inferir que:

- **Si existe mayor cantidad de agua la tasa fotosintética en la planta podría aumentar:** esto explicaría el porqué la cantidad de carbohidratos no estructurales es mayor en bosque húmedo que en bosque semi-húmedo^[75].
- **En condiciones de déficit hídrico el crecimiento se ralentiza:** esto implica la acumulación de carbohidratos, y a su vez explica la mayor concentración de carbohidratos que presentan los clones del bosque seco tropical con respecto a bosque húmedo tropical^[76].
- **La alta adaptabilidad de *Theobroma cacao* L. hace que bajo condiciones de estrés ambiental este modifique su metabolismo de manera que pueda sobrevivir frente a adversidades:** esto explica el porqué la concentración de carbohidratos es mayor en bosque húmedo y bosque seco tropical que en bosque semi-húmedo, considerando que esta zona no representa estrés debido a sus condiciones intermedias^[50].

Se ha descrito que la sacarosa y los azúcares reducidos se acumulan bajo condiciones de estrés y que reduciendo el contenido de agua en plantas mantenidas bajo condiciones controladas incrementa los niveles de azúcares en hojas^[66,77].

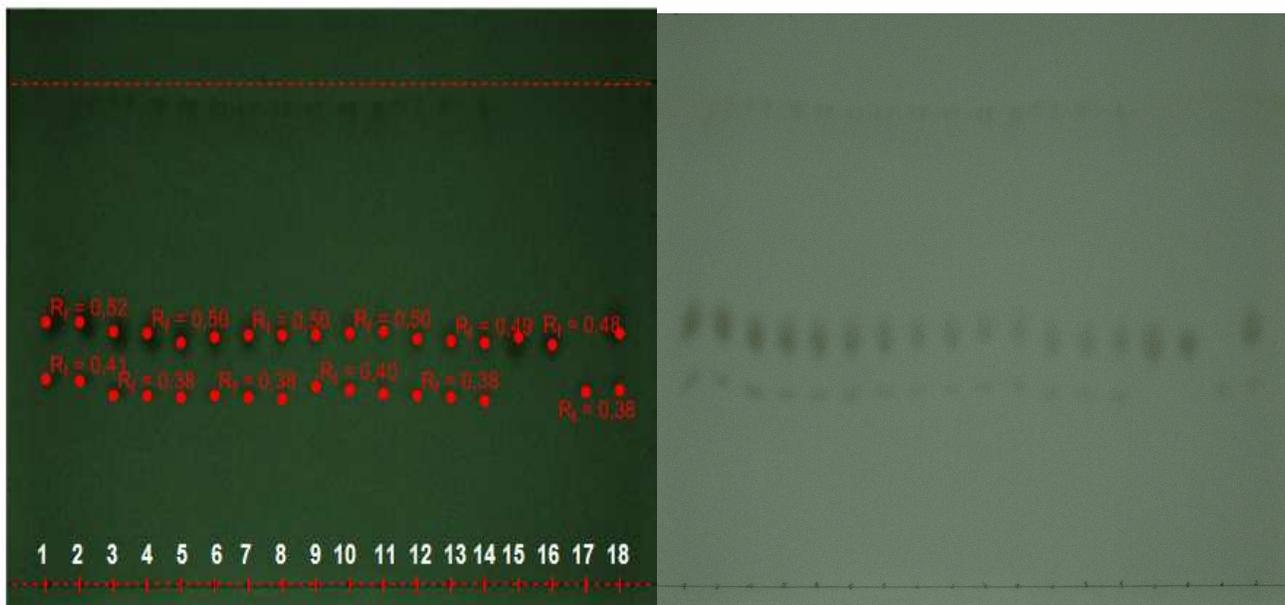
Las hojas de plantas estresadas de *Ctenanthe setosa* (bajo condiciones de déficit de agua) tienden a acumular más carbohidratos de baja masa molecular^[67] y este incremento en la cantidad de fructosa, glucosa y sacarosa indica adaptaciones metabólicas de las hojas ante condiciones de déficit de agua para contribuir así al ajuste osmótico.



5.2.1 Análisis cualitativo de carbohidratos por CCF.

El análisis cualitativo de los carbohidratos no estructurales presentes en los extractos etanólicos foliares se realizó por medio de cromatografía de capa fina utilizando la mezcla de solventes metanol: acetato de etilo: ácido acético: agua (1:6:1,5:1) y como reactivo revelador de carbohidratos, difenilamina en anilina obteniéndose los siguientes resultados:

Figura 10. Cromatografía de Capa Fina de los extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L. procedente de los clones de las tres localidades estudiadas.



Sistema de solventes metanol: acetato de etilo: ácido acético: agua (1:6:1,5:1), placa revelada con difenilamina en anilina, foto tomada bajo luz blanca después de revelar (foto de la derecha con mayor brillo y sin los Rf). Clones de Padrón (bosque húmedo tropical): **1.** EEM029, **2.**EEM012, **3.**EEM010, **4.**EEM028 y **5.**EEM007; clones de Tacariguaita (bosque seco tropical): **6.**EEM011, **7.**EEM010, **8.**EEM028 y **9.**EEM007; clones de Tesoro (bosque semi húmedo tropical): **10.**EEM012, **11.** EEM011 **12.** EEM029, **13.**EEM028 y **14.**EEM007. Patrones: **15.**fructosa, **16.**glucosa, **17.**sacarosa y **18.** Mezcla de patrones.

En la figura anterior se observa que los carbohidratos no estructurales de baja masa molecular acumulados por *Theobroma cacao* L. son la fructosa y/o glucosa y sacarosa, estos se encuentran presentes en todos los clones analizados pues son esenciales en el intercambio energético tanto en plantas como animales, siendo la



glucosa el monómero activo para formar la celulosa. A pesar de que la glucosa y la fructosa poseen el mismo Rf (0,48) se puede sugerir que ambas se encuentran presentes en *Theobroma cacao* L. debido al carácter universal de estos dos azúcares en el reino vegetal^[67].

5.3 Cuantificación de prolina libre.

Tal como se mencionó anteriormente, para llevar a cabo la cuantificación de la Prolina libre se utilizó el extracto etanólico descrito en el apartado de carbohidratos. En este caso se hizo uso de la reacción específica entre la ninhidrina y los aminoácidos para formar complejos de color azul-violeta o amarillo, como en el caso de la Prolina, con un máximo de absorción en el visible a unos 520nm. Los datos de regresión lineal se encuentran en el anexo (**gráfico 11**).

Los valores de Prolina ($\mu\text{g}/\text{mg}$) libre para cada clon en su respectivo ambiente se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Concentración de prolina libre ($\mu\text{g}/\text{mg}$) contenida en material foliar de distintos clones de las tres localidades estudiadas.

Clon	Localidad Padrón *	CV %	Localidad Tesoro*	CV %	Localidad Tacariguaita*	CV %
EEM 029	0,91 \pm 0,02 (C)	2,2	0,40 \pm 0,01 (D)	2,5	0,55 \pm 0,01 (C)	1,8
EEM 011	1,33 \pm 0,01 (A)	0,8	0,552 \pm 0,003 (C)	0,5	0,49 \pm 0,02 (C)	4,1
EEM 012	1,20 \pm 0,01 (A)	0,8	0,24 \pm 0,01 (E)	4,2	0,73 \pm 0,02 (B)	2,7
EEM 010	1,11 \pm 0,02 (B)	1,8	1,20 \pm 0,06 (A)	5	0,45 \pm 0,01 (D)	2,2
EEM 028	1,26 \pm 0,09 (A)	7,1	0,86 \pm 0,04 (B)	4,7	0,53 \pm 0,02 (C)	3,8
EEM 007	1,26 \pm 0,04 (A)	3,2	1,16 \pm 0,02 (A)	1,7	1,07 \pm 0,03 (A)	2,8

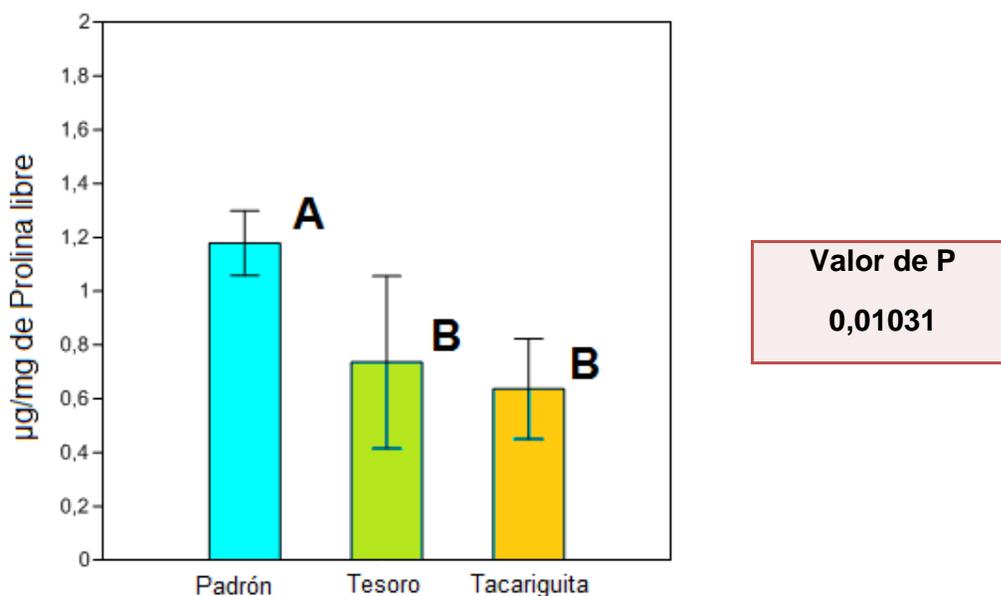
Se utilizó reactivo de ninhidrina (ninhidrina anhidra, ácido acético glacial concentrado y ácido fosfórico 6M) para formar un complejo con la Prolina contenida en los extractos etanólicos del material foliar, dicho complejo fue extraído con tolueno y se midió a 520nm. Para cada clon se realizaron tres (3) extracciones y cada una fue medida tres (3) veces. **Los valores representan el promedio de cada tratamiento \pm el error estándar y el coeficiente de variación (CV), (Test DGC, $p \leq 0.05$).** Medias de una misma localidad con una letra común no son significativamente diferentes.

* **Localidad Padrón** bosque húmedo, **Localidad Tesoro** bosque semi-húmedo, **Localidad Tacariguaita** Bosque Seco; todas ubicadas en el Estado Miranda.



A simple vista podemos observar en la tabla que hubo una mayor cantidad de prolina libre en los clones de la localidad Padrón que corresponden al bosque húmedo tropical mientras que en los otros entornos se observan cantidades menores de prolina.

Gráfica 5. Variación en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de Prolina libre aislada de clones de *Theobroma cacao* L. de las tres localidades.



Los valores representan las medias de cada tratamiento \pm el error estándar (ANOVA, Test DGC $p \leq 0.05$). Medias con letras similares no son significativamente diferentes.

A través del diagrama de barras se puede inferir que no existe diferencia entre la cantidad de prolina contenida en los clones provenientes de Tesoro y Tacariguita. Observando una notoria diferencia entre Padrón con respecto a Tacariguita, en esta localidad (Padrón) los clones acumularon la mayor cantidad de prolina libre.

Los estomas son estructuras epidérmicas distribuidas en patrones regulares en el haz y envés de las hojas, que permiten captar CO_2 para iniciar el proceso fotosintético. Además, mediante la apertura y cierre de los mismos, las plantas evitan una pérdida excesiva de vapor de agua. La apertura y cierre de los mismos



está regulado por factores externos (luz, humedad, temperatura, etc.) e internos (concentración de aminoácidos, ácido abscísico, etc.). El cierre de estos provoca la ralentización metabólica y consecuentemente la disminución del crecimiento. Aminoácidos como la prolina frenan la producción de ácido abscísico y el glutámico, favoreciendo la apertura de estomas. En condiciones de sequía, la presencia de prolina en las células vegetales disminuye, para evitar así la apertura de los estomas y a su vez la pérdida de agua mientras que en condiciones de humedad elevada se disparan los niveles de prolina, favoreciendo la apertura de los estomas y a su vez el crecimiento de la planta. La acumulación de osmolitos como la prolina, contribuyen tanto al ajuste osmótico como a la protección de las proteínas y las membranas celulares en las plantas, y esta acumulación se ha observado que aumenta ante condiciones estresantes tanto en plantas, como en bacterias y hongos^[78].

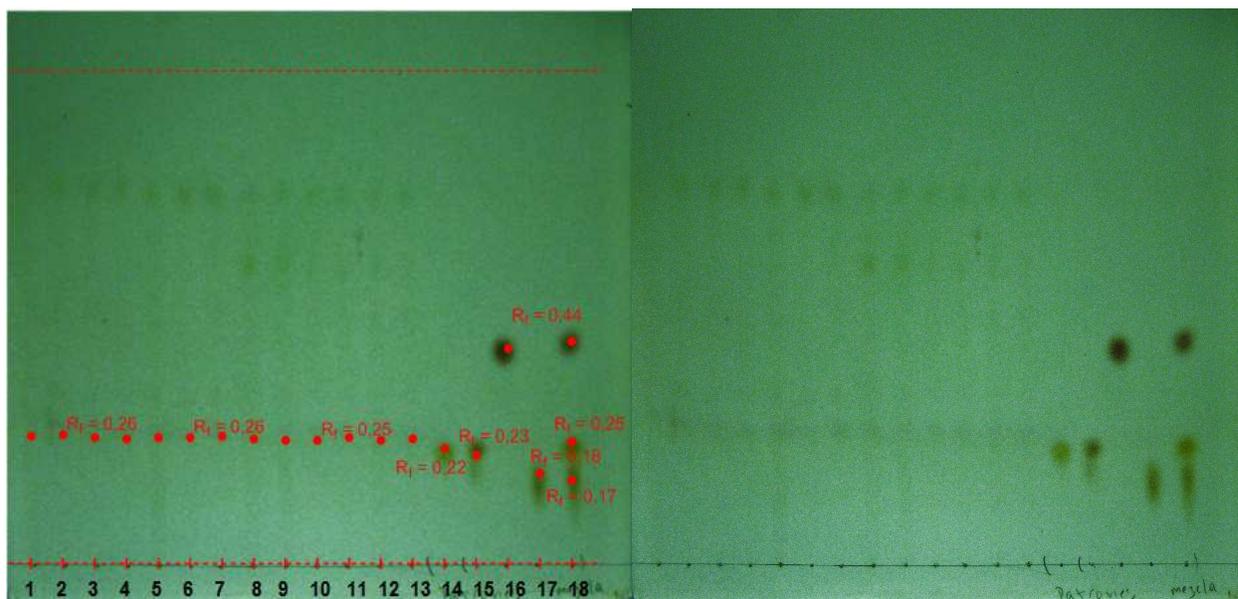
El efecto de la interacción genotipo-ambiente en el contenido de aminoácidos esenciales en arroz fue estudiado por Wu et al., en 2004 encontrando que existe un efecto genético y un efecto de la interacción genotipo-ambiente en el contenido de algunos aminoácidos en particular^[79].

5.3.1 Análisis cualitativo de aminoácidos por CCF.

El análisis cualitativo de los aminoácidos presentes en los extractos etanólicos foliares se realizó por medio de cromatografía de capa fina utilizando la mezcla de solventes butanol: ácido acético: agua (4:1:1). Se utilizó el reactivo ninhidrina como revelador y se obtuvieron los siguientes resultados:



Figura 11. Cromatografía de Capa Fina de los extractos etanólicos de clones de *Theobroma cacao* L. procedente de las tres localidades estudiadas.



Sistema de solventes butanol: ácido acético: agua (4:1:1), placa revelada con ninhidrina, foto tomada bajo luz blanca después de revelar. Clones de Padrón (bosque húmedo tropical): **1.** EEM029, **2.**EEM012, **3.**EEM010, **4.**EEM028 y **5.**EEM007; clones de Tacariguita (bosque seco tropical): **6.**EEM011, **7.**EEM010, **8.**EEM028 y **9.**EEM007; clones de Tesoro (bosque semi húmedo tropical): **10.**EEM012, **11.** EEM029, **12.**EEM028 y **13.**EEM007. Patrones: **14.** Prolina, **15.** serina, **16.** Isoleucina, **17.** Asparagina y **18.** Mezcla de patrones.

Se pudo evidenciar la presencia de la prolina que se observan como pálidas manchas amarillas con un Rf de 0,22 aproximadamente. No se puede descartar la presencia de la serina ya que tiene el mismo Rf (0,23 aproximadamente) que la prolina y su color al revelar es un rosado claro. Según Z. Kalvatchev (1998) el aminoácido libre mayoritario presente en *Theobroma cacao* L. es la prolina acumulando concentraciones que van desde 0,5 a 2 ppm y esto se debe a su importantísimo rol en el ajuste osmótico celular. La cantidad de aminoácidos en plantas varía según su la zona de la misma, por ejemplo los aminoácidos se acumulan en formas de poli-péptidos (proteínas) comúnmente en las semillas y frutos^[80].



5.4 Cuantificación de ligninas.

Como se sabe las ligninas en medio básico se solubilizan, absorbiendo a unos 280nm. Se preparó una curva de calibración externa para la lignina comercial preparando patrones de 5 a 100ppm. Datos de regresión lineal se encuentran en los anexos (**gráfico 13**).

Tabla 8. Concentración de ligninas ($\mu\text{g}/\text{mg}$) contenidas en material foliar de distintos clones en las tres localidades estudiadas.

Clon	Localidad	CV	Localidad	CV	Localidad	CV
	Padrón*	%	Tesoro*	%	Tacariguita*	%
EEM 029	12,2 \pm 0,7 (D)	5,7	13,8 \pm 0,3 (C)	2,2	8,5 \pm 0,4 (C)	4,7
EEM 011	16,4 \pm 0,4 (C)	5,4	12,7 \pm 0,6 (D)	4,7	8,2 \pm 0,3 (C)	3,7
EEM 012	11,4 \pm 0,4 (D)	3,5	12,0 \pm 0,1 (D)	0,8	6,0 \pm 0,3 (E)	5
EEM 010	29 \pm 1 (A)	3,5	14,5 \pm 0,5 (C)	3,4	11,8 \pm 0,4 (A)	3,4
EEM 028	23,8 \pm 1,5 (B)	6	44 \pm 2 (A)	4,6	7,3 \pm 0,3 (D)	4
EEM 007	27 \pm 2 (A)	6,6	23,4 \pm 1,6 (B)	6,9	9,3 \pm 0,2 (B)	2

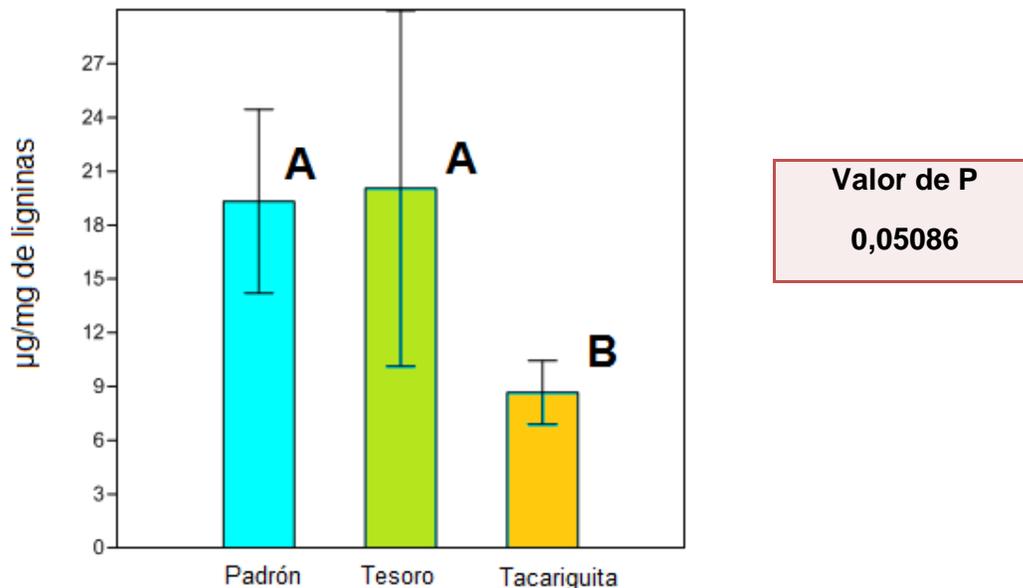
Se midió la solución de ligninas a pH 12 ajustado con NaOH 0,1M contra un blanco del mismo extracto llevado a pH 7 con buffer fosfato. Las absorbancias se leyeron a 280nm. Para cada clon se realizaron tres (3) extracciones y cada una fue medida tres (3) veces. **Los valores representan el promedio de cada tratamiento \pm el error estándar y el coeficiente de variación (CV), (Test DGC, $p \leq 0.05$).** Medias de una misma localidad con una letra común no son significativamente diferentes.

* **Localidad Padrón** bosque húmedo, **Localidad Tesoro** bosque semi-húmedo, **Localidad Tacariguita** Bosque Seco; todas ubicadas en el Estado Miranda.

En la tabla anterior se puede observar que para el clon **EEM028**, la producción de ligninas en Tesoro fue mucho mayor que en Padrón y Tacariguita; mientras que el resto de los clones tuvo una concentración de ligninas similar en Padrón y Tesoro. Para bosque seco tropical se observó la menor producción de ligninas. Para verificar este hecho se realizó un ANOVA al igual que las cuantificaciones anteriores.



Gráfica 6. Variación en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ligninas aisladas de clones de *Theobroma cacao* L. en las tres localidades.



Los valores representan las medias de cada tratamiento \pm el error estándar (ANOVA, Test DGC $p \leq 0.05$). Medias con letras similares no son significativamente diferentes.

En el diagrama se muestra la igualdad de las medias de Padrón y Tesoro, con excepción del clon **EEM028**. Sin duda Tacariguita registró la menor producción de ligninas de los tres ambientes. Vemos como los intervalos de dispersión de datos (error estándar) toman valores en común entre el Tesoro y Tacariguita haciendo que no existan diferencias estadísticas a pesar de la notoria diferencia entre las medias de estos ambientes.

Se conoce muy poco acerca de los efectos de la sequía en la biosíntesis de ligninas. Alvarez et al. (2008) observaron una reducción en la cantidad de ácido ferúlico y un aumento de los ácidos p-cumárico y cafeico en la savia del xilema de maíz después de 12 días al aumentar la cantidad de agua. Según los autores, el aumento de los precursores de la lignina libre de la savia del xilema, así como la actividad de la peroxidasa aniónica reducida, podría ser un indicio de que la sequía



disminuye la biosíntesis de la lignina en el maíz^[81]. Diferentes regiones de la raíz del maíz pueden responder de manera diferente a la sequía, como la deposición de lignina puede ser mayor en una región específica de la raíz o en ciertas épocas de estrés^[82]. Diferentes regiones de la raíz del maíz pueden responder de manera diferente a la sequía, al igual que se comporta la deposición de lignina, que puede ser mayor en una región específica de la raíz o en ciertas épocas de estrés^[83-84]. Se ha demostrado que bajo estrés hídrico la parte basal de las raíces de las plantas de maíz muestran una mayor reducción en el crecimiento de la región apical. Esta reducción se asoció con un incremento en la expresión de dos genes implicados en la biosíntesis de la lignina: cinnamoyl-CoA reductasa 1 y 2. La reducción también fue asociada con un aumento en la deposición de lignina, que endureció la extensibilidad de la pared celular y disminuyó la expansión de la pared celular. En estas plantas, la reducción del crecimiento de la raíz basal puede mejorar la disponibilidad de agua, minerales y azúcares, factores necesarios para mantener un crecimiento mínimo y la supervivencia de las células jóvenes en la porción más apical y facilitar la recuperación del crecimiento después de la rehidratación^[83].

Bok-Rey et al., 2007, estudiaron la biosíntesis de ligninas y su importancia funcional durante el estrés hídrico se estudió en las hojas de *Trifolium repens* sometidas a 28 días de sequía. La reducción del crecimiento de la hoja se produjo simultáneamente con el aumento en la biosíntesis de ligninas. Las actividades de las enzimas implicadas en la biosíntesis revelaron que las respuestas de la enzima a la sequía pueden variar, dependiendo del período en el cual las plantas están expuestas a la sequía^[85].



6. CONCLUSIONES.

La producción de compuestos fenólicos varía en los clones por localidad y entre las localidades. Los clones EEM028 y EEM029 cultivados en la localidad padrón (bosque húmedo) fueron los que presentaron mayor contenido de fenoles totales. A través del análisis cualitativo por cromatografía de capa fina se pudo evidenciar la presencia de catequinas, ácido clorogénico y rutina (fenoles glicosilados) en todos los clones estudiados.

La cuantificación de ligninas arrojó que la biosíntesis de las mismas en material foliar fue mayor en los clones procedentes de Padrón (bosque húmedo tropical) acumulando mayor cantidad de las mismas, mientras que en Tacariguita (bosque seco) la acumulación fue menor. Los clones que acumularon mayor cantidad de ligninas fueron EEM028 y EEM007, procedentes de Tesoro y padrón respectivamente.

En los clones procedentes de Tacariguita (bosque seco tropical) se observó la mayor acumulación de carbohidratos no estructurales en comparación con los clones procedentes de las otras dos localidades, esto puede asociarse a que en condiciones de déficit hídrico el crecimiento de la planta se ralentiza permitiendo así una acumulación de carbohidratos. Los clones EEM011 y EEM007 cultivados en Tacariguita presentaron la mayor cantidad de carbohidratos no estructurales. Mediante el análisis cualitativo se logró evidenciar la presencia de glucosa, fructosa y sacarosa en todos los clones provenientes de los tres ambientes estudiados.

Los clones que acumularon la mayor cantidad de prolina fueron los procedentes de Padrón (bosque húmedo tropical) dejando en claro que la humedad elevada dispara los niveles de prolina favoreciendo la apertura de los estomas y acelerando el proceso de crecimiento en la planta. Los clones EEM011, EEM028 y EEM007 procedentes de padrón acumularon la mayor cantidad de prolina libre. El análisis cualitativo realizado a través de la cromatografía de capa fina evidenció solo la presencia de prolina con respecto a los aminoácidos usados como patrones.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] **Ploetz, R.C. (2007)**. Cacao disease: Important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology* 97 (12): 1634-1639.
- [2] **Argout X., Fouet O., Wincker P., Gramacho K., Legavre T., Sabau X., Risterucci A. M., Da Silva C., Cascardo J., Allegre M., Kuhn D., Verica J., Courtois B., Loor G., Babin R., Sounigo O., Ducamp M., Gultinan M. J., Ruiz M., Alemanno L., Machado R., Phillips W., Schnell R., Gilmour M., Rosenquist E., Butler D., Maximova S. y Lanaud C. (2008)**. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma Cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics* 9: 1-19.
- [3] **Montamayor J.C., Risterucci A.M., López P. A., Ortiz C.F., Moreno A. y Lanaud C. (2002)**. Cacao Domestication I: the origin of cacao cultivated of the Mayas. *Heredity* (89): 380-386.
- [4] **Montamayor J.C., A.N. Bisternucci, Laurent V., Moreno A. y Lanaud C. (1997)**. The genetic diversity of Criollo cacao and the consequence for quality breeding. Ponencia presentada en I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. Maracay, Venezuela: 33-56.
- [5] **Montamayor J.C., Risterucci A.M., Heath M. y Lanaud C. (2003)**. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity* 91 (3): 322-330. NCBI. *Theobroma cacao* L. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>. Consultada en febrero de 2011.
- [6] **Montamayor J. C., Lanchenaud P., Da Silva e Mota J. W., Loor R., Kuhn, D. N., Brown J.S. y Schnell R. (2008)**. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE* 3 (10): e3311. doi:10.1371/journal.pone.003311.



- [7] **Quintero M. y Díaz K. (2004).** El mercado mundial del Cacao. Agroalimentaria. http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/centros_investigacion/ciaal/agroalimentaria/anum18/articulo18_4.pdf, Acceso febrero 2011.
- [8] **Arciniegas A.M. (2005).** Caracterización de árboles superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 126 p.
- [9] **Bartley B.G.D. 1970.** Yield variation in the early productive years in trials with cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica* (19): 199-206.
- [10] **ICCO.** International Cocoa Organization. (2011). ICCO Annual Report <http://www.icco.org/>. Acceso 2012.
- [11] **ICCO.** International Cocoa Organization. (2006). ICCO Annual Report <http://www.icco.org/>. Acceso 2012.
- [12] <http://www.ibce.org.bo> Acceso 2012.
- [13] **ICCO.** International Cocoa Organization. (2005). ICCO Annual Report <http://www.icco.org/>, Acceso 2012.
- [14] **Portillo E., Segnini L. y Parra R. (2006).** Importancia en la calidad y la denominación de origen en la producción de cacao en Venezuela. Memoria *FORO: "Denominación de Origen y Certificación de Calidad"*. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela: 10 p.
- [15] **Portillo E., Graziani de Fariñas L. y Cros E. (2006).** Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ* 23(1): 51-59.
- [16] **CORPOANDES. (2009).** <http://www.corpoandes.gov.ve>, Acceso: 2012.
- [17] **FAO (2012).** <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acceso 2012.
- [18] **Reyes H. y Capriles de Reyes C. (2000).** El Cacao en Venezuela. Venezuela, moderna tecnología para su cultivo. Editado por Chocolates El Rey, C.A. Caracas, Venezuela: 270 pp.



[19] Portillo E. (2000). Influencia de la fermentación en la calidad del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Tesis de Maestría. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 147p. PORTILLO, E. 2000. Influencia de la fermentación en la calidad del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Tesis de Maestría. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 147p.

[20] Moreno A. (2000). La investigación venezolana en cacao: Situación actual del mejoramiento genético. SIMPOSIO: La Investigación Venezolana en Cacao: Situación Actual, I Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. 1997 Maracay, Venezuela.

[21] Campo Marquina J. (2005) "Venezuela se olvida del cacao" en Observatorio de la Economía Latinoamericana Número 46.

[22] AGROCADENAS FAO. (2006). Cadena de Cacao. Producción en grano. http://www.agrocadenas.gov.co/cacao/reportes/fao_09_0661_produccion.pdf, Acceso: 2010.

[23] Sukha D.A. y Buttler D.R. (2007). The CPCP/IICO/INIAP Cocoa Flavour Project – Investigating the Spectrum of Fine Flavour Within Genotypes and Between Origins. Ingenio Newsletter. Cocoa Research Unit, University of West Indies, Trinidad. Trabajo presentado en la reunión anual de COPAL, Costa Rica (2006) en González, E.; Denominación de origen cacao Chuao Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen. 1-62.

[24] Portillo E., Graziani de Fariñas L. y Cros E. (2006). Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ* . (23): 1. 51-59.

[25] Reyes E.H., Vivas J. y Romero S.A. (1999). La calidad del cacao. I. Factores determinantes de la calidad. FONIAP Divulga 61. http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd61/calicac.html. Acceso 2012.



- [26] **Wollgast J. y Anklam E. (2000).** Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research Internacional* 33: 423–447.
- [27] **Quiroz J.V. (2012).** Influencia de la agronomía y cosecha sobre la calidad del cacao. Boletín técnico 147. Estación experimental litoral del sur. Programa nacional del cacao. <http://www.unl.edu.ec/agropecuaria/wp-content/uploads/2012/03/agronomic.pdf>. Acceso 2012.
- [28] **Croteau R., Kutchan T.M. y Lewis N.G. (2000).** Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan, Gruissem, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.
- [29] **Lincol T. y Zeiger E. (2006).** Secondary Metabolites and Plant Defense. En: *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.
- [30] **Palm C. y Rowland A. (1997).** A minimum dataset for characterization of plant quality for decomposition. In. *Driven by nature: plant litter quality and decomposition*. Eds. Cadisch, G; Giller, K. CAB International. Wallingford, UK. p. 379-392.
- [31] **Schroth G. (2003).** Decomposition and nutrient supply from biomass. In *Trees, crops and soil fertility: concepts and research methods*. Schroth, G; Sinclair, F. (Eds). CAB International. Wallingford, UK. 437.
- [32] **Swain T. (editor). (1973).** Chemistry in evolution and systematics. Butterworth, Londres (89): 380-386.
- [33] **Levin D.A. (1976).** The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annals Reviews of Ecology Systematics* 7: 121-159.
- [34] **Cronquist A. (1977).** On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. *Plant Systematic Evolution*. Supplement II (1): 179-189.



- [35] **Goodwin T.W. (1971).** Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. *Proceedings of the Phytochemical Society symposium, Liverpool, April 1970.* Edited by T. W. Goodwin. Academic Press, Londres: 121-159.
- [36] **Robinson T. (1981).** *The biochemistry of alkaloids.* 2^a ed. Springer, Nueva York (72): 211-215.
- [37] **Marcano D. y Hassegawa M. (1991).** Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela, Concejo de Desarrollo científico y Humanístico, Caracas, Venezuela, Cap. 3, 4 y 5.
- [38] **Djocgoue P.F., Boudjeko T., Mbouobda H. D., Nankeu D. J., Hadrami E. y Omokolo N.D. (2007).** Heritability of Phenols in the Resistance of *Theobroma cacao* against *Phytophthora megakarya*, the Causal Agent of Black Pod Disease. *Journal of Phytopathology* 155: 519-525.
- [39] **Adamson G., Lazarus S., Mitchell A., Prior R., Cao G., Jacobs P., Kremers B., Hammerstone J., Rucker R., Ritter K., y Schmitz H. (1999).** HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10): 4184-4188.
- [40] **Bernal E.J. (1991).** Pastos y Forrajes Tropicales; Producción y Manejo. Banco Ganadero, Bogotá. 544.
- [41] **Pichard G. y Alcalde J.A. (1990).** Determinación de carbohidratos no estructurales. In Ruiz, M.E. y Ruiz, A., eds. *Nutrición de Rumiantes; Guía metodológica de Investigación.* IICA, San José. pp. 3-20.
- [42] **Botrel M.A., Gomide J.A. (1981).** Importancia do teor dos carboidratos dos meristemas apicais para a rebrota do capim Jaragua (*Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf). *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 10: 426-441.
- [43] **McIlroy R.J. (1967).** Carbohydrates of grassland herbage. *Herbage Abstracts* 37: 79- 87.



- [44] **Riquelme A., Monneveux P. y Pinto M. (1997).** Cuantificación de clorofilas, proteínas y prolina en hojas de plantas sometidas a estrés ambientales (155): 519-525. <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro14/cap3.12.htm>.
- [45] **Parsons L. (1991).** Respuestas de la planta a la deficiencia de agua. En mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables. Noriega Editores. México. <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro14/cap3.12.htm>
- [46] **Boudet A. (2007).** Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722–2735.
- [47] **Muller R.N., Kalisz P.J. y T.W. Kimmerer. (1987).** Intraspecific variation in production of astringent phenolics over a vegetation-resource availability gradient. *Oecologia* 72: 211-215.
- [48] **Ricklefs R.E. y Matthew K.K. (1982).** Chemical characteristics of the foliage of some deciduous trees in southeastern Ontario, *Canadian Journal of Botany* 60 (10): 2037-2045.
- [49] **Alston R.E. (1967).** Biochemical systematics. In: Dobzhansky TH, Hecht MK, Steere WC (eds) *Evolutionary biology*, vol. Appleton-Century-Crofts, New York, pp 197-305.
- [50] **Schultz J.C., Nothnagle P.J. y Baldwin I.T. (1982).** Seasonal and individual variation in leaf quality of two northern hardwoods tree species. *American Journal of Botany* 69: 753-759.
- [51] **McClure J.W. (1979).** The physiology of phenolic compounds in plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 12:525-556.
- [52] **Sahai O.P. y Shulert M.L. (1984).** Environmental Parameters Influencing Phenolics Production by Batch Cultures of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology and Bioengineering* 26 (2):111-20.
- [53] **Ghasemi K., Ghasemi Y., Ehteshamnia A., Nabavi S., Nabavi S., Ebrahimzadeh M. y Pourmorad F. (2011).** Influence of environmental factors on



antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (7):1128-1133.

[54] Michalak P.M. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Environmental Studies* 15 (4): 523-530.

[55] Omokolo N.D., Nankeu D.J., Niemenak N. y Djocgoue P. F. (2002). Analysis of amino acids and carbohydrates in the cortex of nine clones of *Theobroma cacao* L. in relation to their susceptibility to *Phytophthora megakarya* Bra. And Grif. *Crop Protection* 21: 395-402.

[56] Daymond A.J. y Hadley P. (2004). The effects of temperature and light integral on early vegetative growth and chlorophyll fluorescence of four contrasting genotypes of cacao (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology* 145: 257-262.

[57] Galyuon I.K.A., McDavid C.R., Lopes F.B., y Spence J.A. (1996). The effects of irradiance level on cocoa (*Theobroma cacao* L.): gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tropical Agriculture* 73: 29-33.

[58] Tezara W., Coronel I., Urich R., Marín O., Jaimez R. y Chacón I. (2009). Plasticidad ecofisiológica de árboles de cacao (*Theobroma cacao* L.) en diferentes ambientes de venezuela ecophysiological plasticity of cocoa trees (*theobroma cacao* L.) from different environments of venezuela. *III CLAE e IXCEB, São Lourenço – MG*. http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_professores/wilmer_tezara.pdf

[59] Pereira G., Villalobos V., Rondón O., Chacón I., Jaimez R. y W. Tezara. (2007). Intercambio gaseoso en diferentes cultivares de cacao. XVII Congreso de Botánica de Venezuela. Maracaibo mayo 21-25. Maracaibo, Venezuela. (299): 152-178.

[60] Elwers S., Zambrano A., Rohsius C. y Lieberei R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research Technology* 229: 937–948.

[61] Dubois M. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and related Substances". *Analytical Chemistry* 28: 530.



- [62] **PAST. PAleontological Statistics. (2009).** Version 1.94b Øyvind Hammer Natural History Museum University of Oslo.
- [63] **Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzani M.G., Gonzales L., Tabalada M. y Roberto C.W. (2008).** INFOSTAT, versión 2008, Grupo infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- [64] **Singleton V.L, Orthofer R y Lamuela-Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- [65] **Skoog D.A., Holler J. y M. Gómez. (2006).** Principios de análisis instrumental. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. 7^{ma} edición: 255-370.
- [66] **Delalonde M., Arret B. y Coumans M. P. (1996).** Development of phenolic compounds in maize anthers (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. *Journal of Plant Physiology* 149: 612-616.
- [67] **Ayaz F.F. (2000).** Water stress effects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setsa* (Rosc.) Eichler. *Canadian Journal of Plant Science* 80: 373.
- [68] **Martini M., Figueira A., Gonçalves C. y Queiroz D. (2008).** Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 31(3): 425-431.
- [69] **Graziani L. y Ortiz L. (2003).** Características químicas de la semilla de diferentes tipos de cacao de la localidad de Cumboto, aragua: *Agronomía Tropical* 53 (2): 133-144.
- [70] **Elwers S., Zambrano A., Rohsius C. y Lieberei R. (2009).** Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research Technology* 229:937–948.
- [71] **Ayaz, F. A., Kadioglu, A. y Turgut, R. (2000).** Water stress effects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler. *Canadian Journal of Plant Science* 80: 373–378.



- [72] **Martinez M., Valencia P., Jimenez U., Mesa E. y Galeano J. (2008).** Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia Facultad de Química Farmacéutica.
- [73] **Rusconi, M. y Conti A. (2009).** *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research* 53: 390-95.
- [74] **Morillo F., Sánchez P., Girón C., Valera A., Muñoz W. y J. Guerra. (2008).** Comportamiento de híbridos de cacao (*Theobroma cacao*) al ataque de *Steirastoma breve* (Coleoptera: Cerambycidae). *Revista Colombiana de Entomología* 34 (2): 151-155.
- [75] **Gonzales J.A., gallardo M., Hilal M. y Prado F.E. (2008).** Variaciones en los niveles de carbohidratos, proteínas solubles y Prolina en plántulas de Quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*) sometidos a distintos regímenes de riego. <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro14/cap3.11.htm>
- [76] **Almeida F. y Valle R. (2008).** Ecophysiology of the cacao tree. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45662-000 Ilhéus, BA, Brasil.
- [77] **Binzel M.L., Hasegawa P.M., Rhodes D., Handa S., Handa A.K. y Bressan R.A. (1987).** Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiology* 84: 1408–1415.
- [78] **Verslues P.E. y Sharma S. (2008).** Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. *The Arabidopsis Book*, Number 8. 2010 American Society of Plant Biologists: 1-23.
- [79] **Wu J.G., Shi C.H., Zhang X.M. y Katsura T. (2004).** Genetic and genotype environment interaction effects for the content of seven essential amino acids in *indica* rice. *Journal of Genetics* 83: 171–178.
- [80] **Kalvatchev Z. (1998).** *Theobroma cacao* L. un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria* 84: 1408–1415.

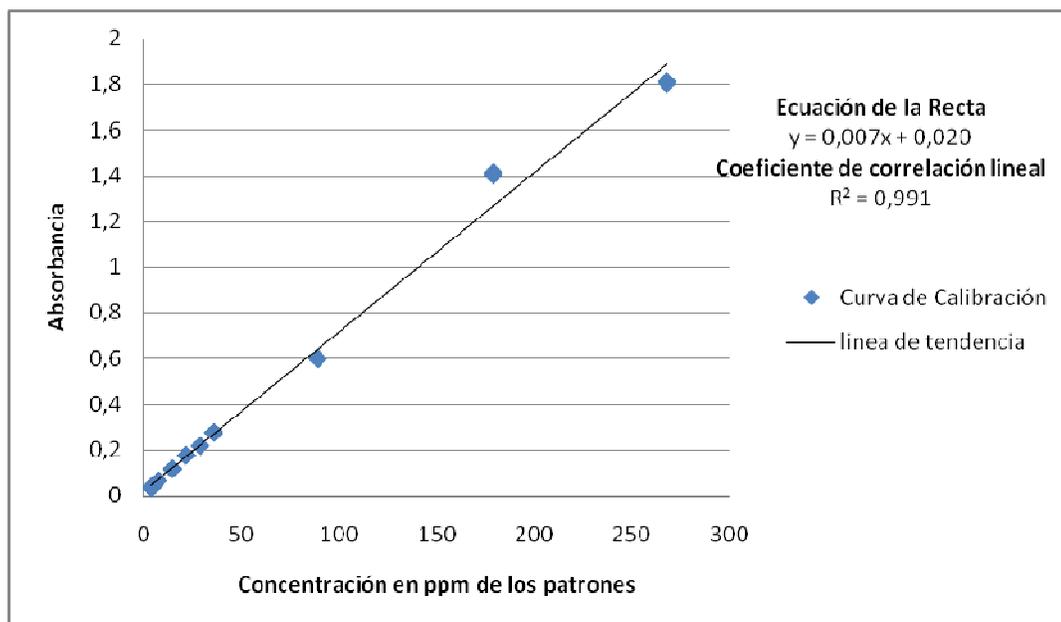


-
- [81] Alvarez S., Marsh E.L., Schroeder S.G. y Schachtman D.P. (2008). Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell and Environment* 31: 325-340.
- [82] Fan L., Linker R., Gepstein S., Tanimoto E., Yamamoto R. y Neumann P.M. (2006). Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology* 140: 603-612.
- [83] Yang L., Wang C.C., Guo W.D., Li X.B., Lu M. y Yu C.L. (2006). Differential expression of cell wall related genes in the elongation zone of rice roots under water deficit. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 390-395.
- [84] Yoshimura K., Masuda A., Kuwano M., Yolota A. y Akashi K. (2008). Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C-3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant and Cell Physiology* 49: 226-241.
- [85] Bok-Rye L., Kil-Yong K., Woo-Jin J., Christophe A., Alain O. y Tae-Hwan K. (2007). Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* 58: 1271-1271.

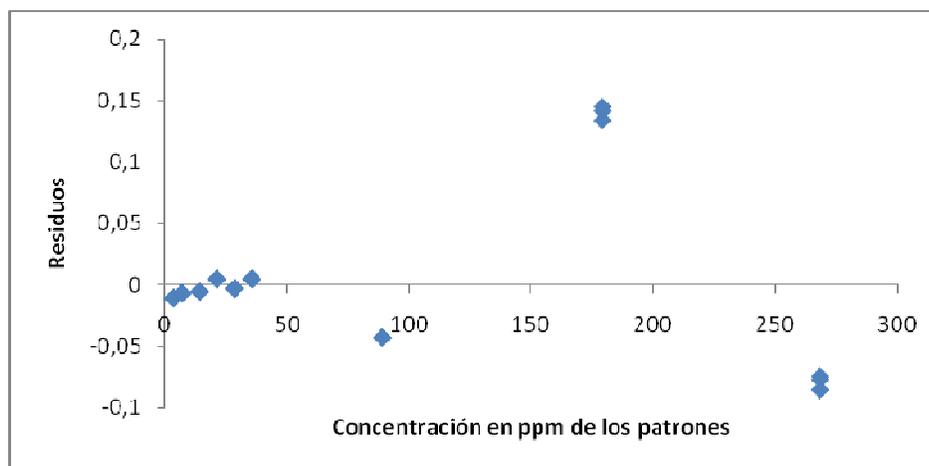


8. ANEXOS.

Gráfica 7. Curva de calibración externa para el ácido clorogénico.

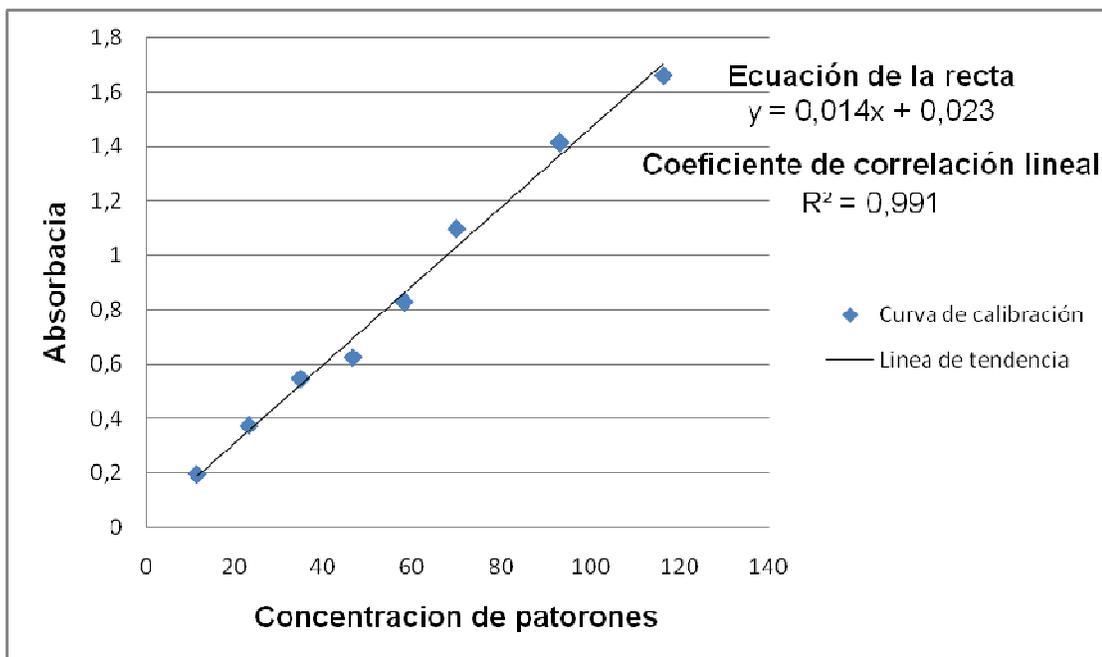


Gráfica 8. Gráfico de residuales de la curva de calibración para el ácido clorogénico.

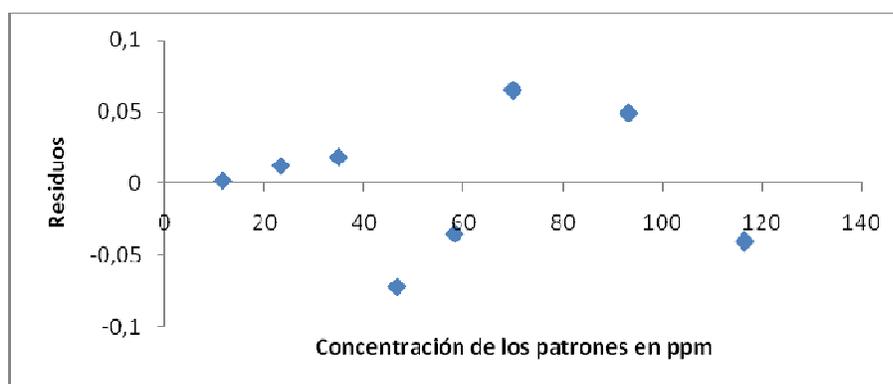




Gráfica 9. Curva de calibración externa para la D-glucosa.

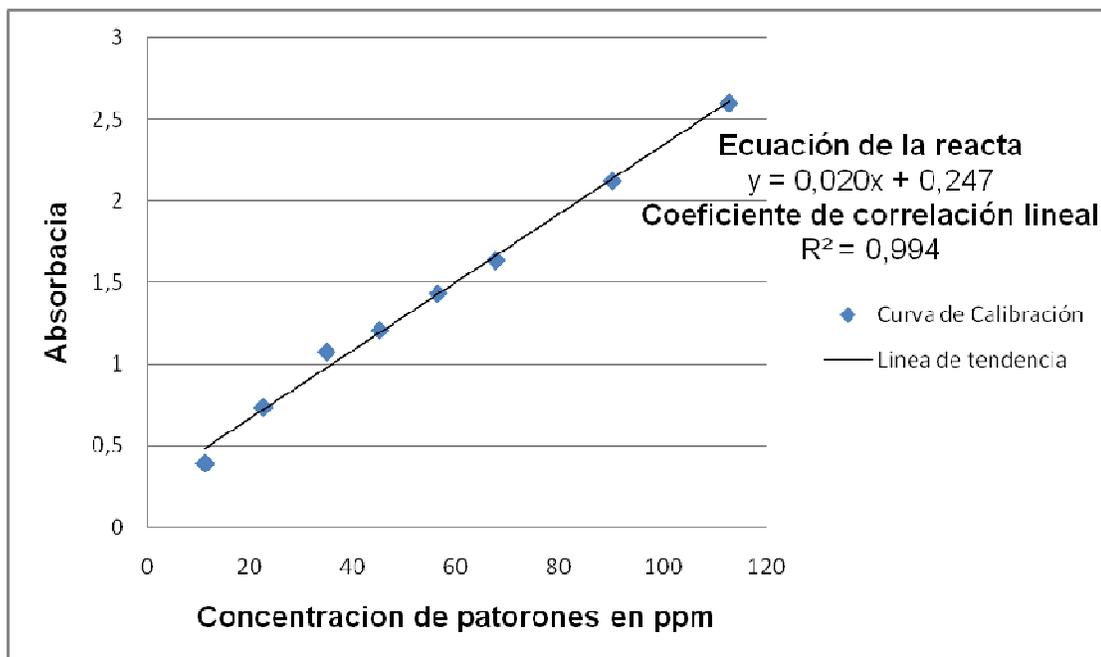


Gráfica 10. Gráfico de residuales para curva de calibración externa de la D-glucosa.

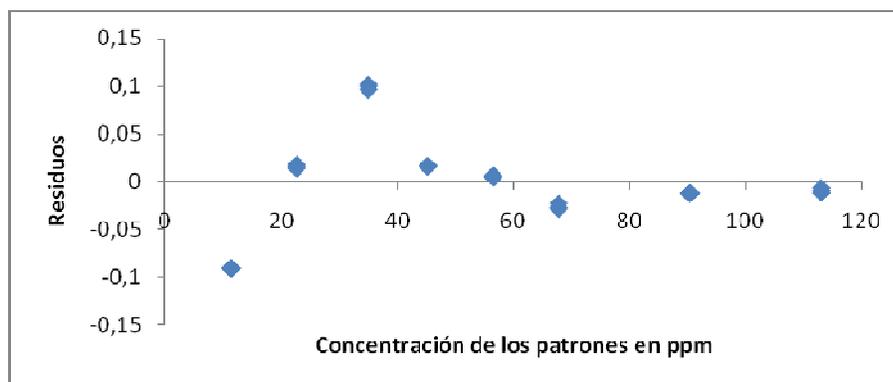




Gráfica 11. Curva de calibración externa para la L-Prolina.

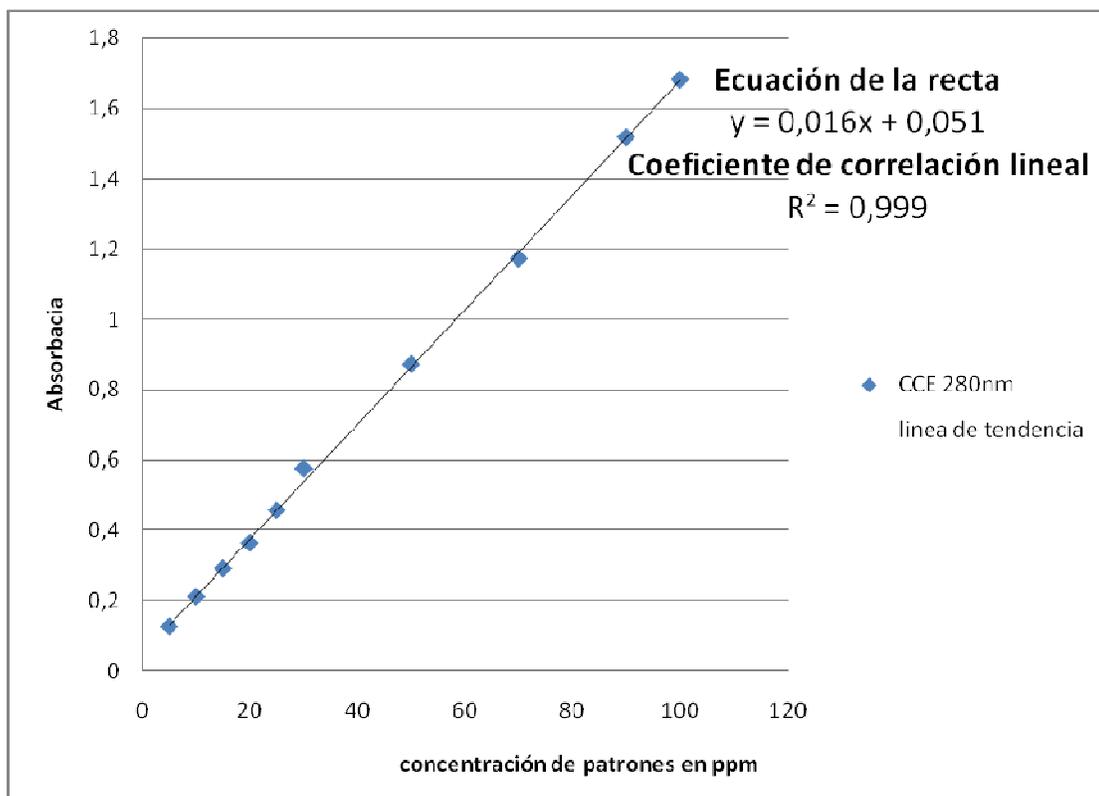


Gráfica 12. Gráfico de residuales de la curva de calibración externa de la L-Prolina.





Gráfica 13. Curva de calibración externa para la lignina comercial.



Gráfica 14. Gráfico de residuos para la curva de calibración externa de la lignina comercial.

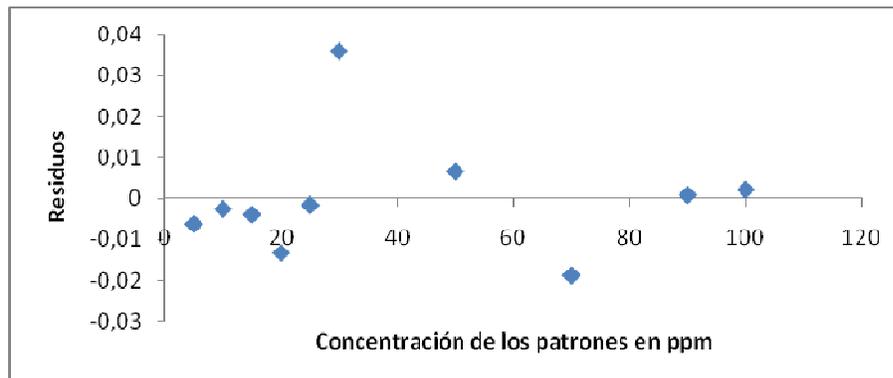


Tabla 9. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos solubles extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao L.* procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbacia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	µm/mg de fenoles	CV (%)	
EEM029	1		1,0842	1520,285714	0,001520286			
			0,0999	1,0838	1519,714286	0,001519714		
				1,0837	1519,571429	0,001519571		
	2			0,9421	1317,285714	0,001317286		
			0,0956	0,9415	1316,428571	0,001316429	14,6±0,7	4,8
				0,9414	1316,285714	0,001316286		
	3			1,0745	1506,428571	0,001506429		
			0,1001	1,0737	1505,285714	0,001505286		
				1,0745	1506,428571	0,001506429		
EEM011	1		0,6168	852,5714287	0,000852571			
			0,1063	0,6169	852,7142857	0,000852714		
				0,6168	852,5714287	0,000852571		
	2			0,7712	1073,142857	0,001073143		
			0,0989	0,7713	1073,285714	0,001073286	8,5±0,5	5,9
				0,7722	1074,571429	0,001074571		
	3			0,6647	921	0,000921		
			0,1033	0,6648	921,1428571	0,000921143		
				0,6654	922	0,000922		
EEM012	1		1,0434	1462	0,001462			
			0,1028	1,0432	1461,714286	0,001461714		
				1,0429	1461,285714	0,001461286		
	2			0,8847	1235,285714	0,001235286		
			0,1017	0,8855	1236,428571	0,001236429	11,9±0,3	2,5
				0,8865	1237,857143	0,001237857		
	3			0,847	1181,428571	0,001181429		
			0,1013	0,8462	1180,285714	0,001180286		
				0,8461	1180,142857	0,001180143		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Cont. Tabla 9. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos solubles extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	µm/mg de fenoles	CV (%)
EEM010	1	0,1046	0,7271	1010,142857	0,001010143	9,3±0,4	4,3
			0,7275	1010,714286	0,001010714		
			0,7284	1012	0,00101012		
	2	0,114	0,7268	1009,714286	0,001009714	9,3±0,4	4,3
			0,7179	997	0,000997		
			0,7275	1010,714286	0,001010714		
	3	0,1131	0,7726	1075,142857	0,001075143	9,3±0,4	4,3
			0,7724	1074,857143	0,001074857		
			0,7724	1074,857143	0,001074857		
EEM028	1	0,1047	1,2609	1772,714286	0,001772714	17,4±0,5	2,9
			1,2616	1773,714286	0,001773714		
			1,2626	1775,142857	0,001775143		
	2	0,1008	1,2819	1802,714286	0,001802714	17,4±0,5	2,9
			1,2808	1801,142857	0,001801143		
			1,281	1801,428571	0,001801429		
	3	0,1049	1,1236	1576,571429	0,001576571	17,4±0,5	2,9
			1,1236	1576,571429	0,001576571		
			1,1241	1577,285714	0,001577286		
EEM007	1	0,1136	0,7362	1023,142857	0,001023143	9,02±0,01	0,1
			0,7364	1023,428571	0,001023429		
			0,7364	1023,428571	0,001023429		
	2	0,1126	0,7314	1016,285714	0,001016286	9,02±0,01	0,1
			0,7316	1016,571429	0,001016571		
			0,7324	1017,714286	0,001017714		
	3	0,109	0,4974	682	0,000682	9,02±0,01	0,1
			0,497	681,4285714	0,000681429		
			0,497	681,4285714	0,000681429		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Tabla 10. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos solubles extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi-húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	µm/mg de fenoles	CV (%)
EEM029	1	0,1033	0,739100029	1027,285756	0,001027286		
	2	0,0998	0,738899996	1026,999994	0,001027		
	3	0,1209	0,739400019	1027,714313	0,001027714		
EEM011	1	0,1124	0,666400005	923,4285789	0,000923429		
	2	0,1001	0,666299989	923,2856981	0,000923286		
	3	0,1196	0,666400005	923,4285789	0,000923429		
EEM012	1	0,0979	0,814199974	1134,571391	0,001134571		
	2	0,1095	0,814	1134,285715	0,001134286		
	3	0,1049	0,814199974	1134,571391	0,001134571		
EEM011	1	0,1124	0,606999983	838,5714046	0,000838571		
	2	0,1001	0,606699993	838,1428472	0,000838143		
	3	0,1196	0,607200016	838,8571663	0,000838857		
EEM012	1	0,0979	0,5015	687,8571434	0,000687857		
	2	0,1095	0,50120001	687,428586	0,000687429		
	3	0,1049	0,501600017	688,0000243	0,000688		
EEM011	1	0,0979	0,674700012	935,2857309	0,000935286		
	2	0,1095	0,674499978	934,9999692	0,000935		
	3	0,1049	0,674800028	935,4286118	0,000935429		
EEM012	1	0,0979	0,590099998	814,4285432	0,000814429		
	2	0,1095	0,590000023	814,2857475	0,000814286		
	3	0,1049	0,590199997	814,5714241	0,000814571		
EEM011	1	0,0979	0,582199981	803,1428295	0,000803143		
	2	0,1095	0,581799974	802,5713912	0,000802571		
	3	0,1049	0,581899999	802,7142721	0,000802714		
EEM012	1	0,0979	0,523699989	719,5714125	0,000719571		
	2	0,1095	0,523999979	719,9999699	0,00072		
	3	0,1049	0,524300029	720,4286124	0,000720429		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Cont. Tabla 10. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos solubles extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi-húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	um/mg de fenoles	CV (%)
EEM010	1		0,475300004	650,428577	0,000650429		
			0,475199987	650,2856962	0,000650286		
		0,1028	0,475400021	650,5714579	0,000650571		
EEM010	2		0,474600007	649,4285814	0,000649429		
			0,474700024	649,5714622	0,000649571		
		0,104	0,475199987	650,2856962	0,000650286	6,3±0,1	2
EEM010	3		0,533200015	733,1428792	0,000733143		
			0,532999982	732,8571175	0,000732857		
		0,0982	0,532999982	732,8571175	0,000732857		
EEM028	1		0,607900013	839,8571619	0,000839857		
			0,607600023	839,4286045	0,000839429		
		0,1032	0,607799997	839,7142811	0,000839714		
EEM028	2		0,646499981	894,9999733	0,000895		
			0,646499981	894,9999733	0,000895		
		0,1032	0,646799971	895,4285307	0,000895429	8,2±0,4	4,8
EEM028	3		0,627799978	868,2856824	0,000868286		
			0,627199997	867,4285676	0,000867429		
		0,1125	0,627099981	867,2856868	0,000867286		
EEM007	1		0,487500002	667,8571454	0,000667857		
			0,487500002	667,8571454	0,000667857		
		0,1073	0,487900009	668,4285837	0,000668429		
EEM007	2		0,602600028	832,2857542	0,000832286		
			0,602100005	831,5714351	0,000831571		
		0,0973	0,602100005	831,5714351	0,000831571	8,1±0,5	6,2
EEM007	3		0,523200025	718,8571786	0,000718857		
			0,522899975	718,428536	0,000718429		
		0,094	0,523200025	718,8571786	0,000718857		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Tabla 11. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos solubles extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles $\mu\text{m/mg}$ de fenoles	CV (%)
EEM029	1	0,5043	691,8571429	0,000691857	6,0 \pm 0,1	2
		0,504299988	691,857126	0,000691857		
		0,504800012	692,5714451	0,000692571		
	2	0,464699973	635,2856764	0,000635286	6,0 \pm 0,1	2
		0,464099993	634,4285616	0,000634429		
		0,464300026	634,7143233	0,000634714		
	3	0,484000017	662,8571672	0,000662857	6,0 \pm 0,1	2
		0,484099974	662,9999629	0,000663		
		0,484599997	663,714282	0,000663714		
EEM011	1	1,097300043	1539,000061	0,001539	14,5 \pm 0,2	1,3
		1,097300043	1539,000061	0,001539		
		1,097499957	1539,285652	0,001539286		
	2	1,02789997	1439,857101	0,001439857	14,5 \pm 0,2	1,3
		1,027500023	1439,285748	0,001439286		
		1,027500023	1439,285748	0,001439286		
	3	1,222499957	1717,857081	0,001717857	14,5 \pm 0,2	1,3
		1,222200026	1717,428608	0,001717429		
		1,222400059	1717,71437	0,001717714		
EEM012	1	0,713500013	990,714304	0,000990714	7,1 \pm 0,5	7
		0,712999989	989,9999849	0,00099		
		0,712899973	989,857104	0,000989857		
	2	0,476199974	651,7142492	0,000651714	7,1 \pm 0,5	7
		0,475899984	651,2856918	0,000651286		
		0,476199974	651,7142492	0,000651714		
	3	0,566499998	780,7142829	0,000780714	7,1 \pm 0,5	7
		0,566300024	780,4286063	0,000780429		
		0,566699972	780,9999594	0,000781		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los $\mu\text{g/mg}$ de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Cont. Tabla 11. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos solubles extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	um/mg de fenoles	CV (%)
EEM010	1	0,0975	0,8468	1181,142857	0,000590571	6,1±0,2	3,3
			0,7965	1109,285714	0,000554643		
			0,8186	1140,857143	0,000570429		
	2	0,093	0,8747	1221	0,0006105	6,1±0,2	3,3
			0,8344	1163,428571	0,000581714		
			0,8521	1188,714286	0,000594357		
	3	0,1145	0,9556	1336,571429	0,000668286	6,1±0,2	3,3
			1,0075	1410,714286	0,000705357		
			1,0287	1441	0,0007205		
EEM028	1	0,1081	0,9559	1337	0,0006685	6,3±0,1	1,6
			0,9555	1336,428571	0,000668214		
			0,9536	1333,714286	0,00066857		
	2	0,0984	0,9149	1278,428571	0,000639214	6,3±0,1	1,6
			0,9015	1259,285714	0,000629643		
			0,9253	1293,285714	0,000646643		
	3	0,1021	0,9233	1290,428571	0,000645214	6,3±0,1	1,6
			0,9316	1302,285714	0,000651143		
			0,9246	1292,285714	0,000646143		
EEM007	1	0,1145	1,2051	1693	0,0008465	3,7±0,2	5,4
			1,2019	1688,428571	0,000844214		
			1,1586	1626,571429	0,000813286		
	2	0,1006	1,057	1481,428571	0,000740714	3,7±0,2	5,4
			0,9966	1395,142857	0,000697571		
			1,0233	1433,285714	0,000716643		
	3	0,1027	1,1189	1569,857143	0,000784929	3,7±0,2	5,4
			1,0501	1471,571429	0,000735786		
			1,0804	1514,857143	0,000757429		

Tabla 12. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos ligados extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao L.* procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	µm/mg de fenoles	CV (%)
EEM029	1	0,0999	1,01	1414,285714	0,000707143		
			1,01	1414,285714	0,000707143		
			1,01	1414,285714	0,000707143		
	2	0,0956	0,9319	1302,714286	0,000651357	7,0±0,1	1,4
			0,9318	1302,571429	0,000651286		
			0,9324	1303,428571	0,000651714		
	3	0,1001	0,9983	1397,571429	0,000698786		
			0,9981	1397,285714	0,000698643		
			0,9983	1397,571429	0,000698786		
EEM011	1	0,1063	0,7413	1030,428571	0,000515214		
			0,741	1030	0,000515		
			0,7413	1030,428571	0,000515214		
	2	0,0989	0,7164	994,8571429	0,000497429	5,1±0,2	3,9
			0,7162	994,5714286	0,000497286		
			0,7164	994,8571429	0,000497429		
	3	0,1033	0,7863	1094,714286	0,000547357		
			0,7861	1094,428571	0,000547214		
			0,7864	1094,857143	0,000547429		
EEM012	1	0,1028	0,8798	1228,285714	0,000614143		
			0,8795	1227,857143	0,000613929		
			0,8798	1228,285714	0,000614143		
	2	0,1017	1,1894	1670,571429	0,000835286	5,8±0,2	3,4
			1,1887	1669,571429	0,000834786		
			1,1889	1669,857143	0,000834929		
	3	0,1013	0,8057	1122,428571	0,000561214		
			0,8053	1121,857143	0,000560929		
			0,8053	1121,857143	0,000560929		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Cont. Tabla 12. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos ligados extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	$\mu\text{m}/\text{mg}$ de fenoles	CV (%)
EEM010	1	0,1046	0,8158	1136,857143	0,000568429	5,4±0,1	1,9
			0,8158	1136,857143	0,000568429		
			0,8166	1138	0,000569		
	2	0,114	0,8864	1237,714286	0,000618857	5,4±0,1	1,9
			0,886	1237,142857	0,000618571		
			0,8863	1237,571429	0,000618786		
	3	0,1131	0,8589	1198,428571	0,000599214	5,4±0,1	1,9
			0,8587	1198,142857	0,000599071		
			0,8597	1199,571429	0,000599786		
EEM028	1	0,1047	0,9589	1341,285714	0,000670643	6,4±0,1	1,6
			0,9588	1341,142857	0,000670571		
			0,959	1341,428571	0,000670714		
	2	0,1008	0,9076	1268	0,000634	6,4±0,1	1,6
			0,9074	1267,714286	0,000633857		
			0,908	1268,571429	0,000634286		
	3	0,1049	0,9771	1367,285714	0,000683643	6,4±0,1	1,6
			0,9766	1366,571429	0,000683286		
			0,9768	1366,857143	0,000683429		
EEM007	1	0,1136	0,8903	1243,285714	0,000621643	5,6±0,3	5,3
			0,8901	1243	0,0006215		
			0,8901	1243	0,0006215		
	2	0,1126	0,8511	1187,285714	0,000593643	5,6±0,3	5,3
			0,8496	1185,142857	0,000592571		
			0,8508	1186,857143	0,000593429		
	3	0,109	0,9261	1294,428571	0,000647214	5,6±0,3	5,3
			0,9263	1294,714286	0,000647357		
			0,9265	1295	0,0006475		

Tabla 13. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos ligados extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi-húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles	µm/mg de fenoles	CV (%)
EEM029	1	0,1033	0,7834	1090,571429	0,000545286		
			0,7436	1033,714286	0,000516857		
			0,7616	1059,428571	0,000529714		
	2	0,0998	0,7891	1098,714286	0,000549357		
			0,7502	1043,142857	0,000521571	5,1±0,2	3,9
			0,7673	1067,571429	0,000533786		
	3	0,1209	0,852	1188,571429	0,000594286		
			0,8553	1193,285714	0,000596643		
			0,8555	1193,571429	0,000596786		
EEM011	1	0,1124	0,6902	957,4285714	0,000478714		
			0,6574	910,5714286	0,000455286		
			0,6725	932,1428571	0,000466071		
	2	0,1001	0,7361	1023	0,0005115		
			0,7036	976,5714286	0,000488286	5,0±0,1	2
			0,7179	997	0,0004985		
	3	0,1196	0,8763	1223,285714	0,000611643		
			0,829	1155,714286	0,000577857		
			0,8498	1185,428571	0,000592714		
EEM012	1	0,0979	0,7449	1035,571429	0,000517786		
			0,7076	982,2857143	0,000491143		
			0,7241	1005,857143	0,000502929		
	2	0,1095	0,7979	1111,285714	0,000555643		
			0,761	1058,571429	0,000529286	5,1±0,2	3,9
			0,7775	1082,142857	0,000541071		
	3	0,1049	0,8	1114,285714	0,000557143		
			0,7626	1060,857143	0,000530429		
			0,7792	1084,571429	0,000542286		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Cont. Tabla 13. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos ligados extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi-húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles	$\mu\text{m}/\text{mg}$ de fenoles	CV (%)
EEM010	1	0,1028	0,9018	1259,714286	0,000629857		
			0,8607	1201	0,0006005		
			0,8789	1227	0,0006135		
	2	0,104	0,9436	1319,428571	0,000659714		
			0,8926	1246,571429	0,000623286	6,0 \pm 0,2	3,3
			0,9152	1278,857143	0,000639429		
	3	0,0982	0,8665	1209,285714	0,000604643		
			0,8164	1137,714286	0,000568857		
			0,8386	1169,428571	0,000584714		
EEM028	1	0,1032	1,0509	1472,714286	0,000736357		
			0,9864	1380,571429	0,000690286		
			1,0152	1421,714286	0,000710857		
	2	0,1032	1,0319	1445,571429	0,000722786		
			0,9796	1370,857143	0,000685429	6,8 \pm 0,2	2,9
			1,003	1404,285714	0,000702143		
	3	0,1125	1,107	1552,857143	0,000776429		
			1,034	1448,571429	0,000724286		
			1,0665	1495	0,0007475		
EEM007	1	0,1073	0,9136	1276,571429	0,000638286		
			0,8614	1202	0,000601		
			0,8846	1235,142857	0,000617571		
	2	0,0973	0,8702	1214,571429	0,000607286		
			0,8224	1146,285714	0,000573143	5,8 \pm 0,2	3,4
			0,8436	1176,571429	0,000588286		
	3	0,094	0,7886	1098	0,000549		
			0,7444	1034,857143	0,000517429		
			0,7639	1062,714286	0,000531357		

Tabla 14. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos ligados extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	um/mg de fenoles	CV (%)
EEM029	1	0,0963	0,52	714,2857143	0,000357143	3,6±0,1	2,8
			0,4963	680,4285714	0,000340214		
			0,5069	695,5714286	0,000347786		
	2	0,1045	0,5579	768,4285714	0,000384214	3,6±0,1	2,8
			0,5356	736,5714286	0,000368286		
			0,5454	750,5714286	0,000375286		
	3	0,1107	0,5904	814,8571429	0,000407429	3,6±0,1	2,8
			0,5674	782	0,000391		
			0,5775	796,4285714	0,000398214		
EEM011	1	0,1063	0,8931	1247,285714	0,000623643	6,1±0,1	1,6
			0,9223	1289	0,0006445		
			0,9236	1290,857143	0,000645429		
	2	0,1007	0,9328	1304	0,000652	6,1±0,1	1,6
			0,9297	1299,571429	0,000649786		
			0,9035	1262,142857	0,000631071		
	3	0,1166	1,0007	1401	0,0007005	6,1±0,1	1,6
			0,9321	1303	0,0006515		
			0,9626	1346,571429	0,000673286		
EEM012	1	0,1029	0,6511	901,5714286	0,000450786	4,5±0,2	4,4
			0,6529	904,1428571	0,000452071		
			0,6554	907,7142857	0,000453857		
	2	0,0975	0,6224	860,5714286	0,000430286	4,5±0,2	4,4
			0,5934	819,1428571	0,000409571		
			0,6061	837,2857143	0,000418643		
	3	0,1026	0,7286	1012,285714	0,000506143	4,5±0,2	4,4
			0,6938	962,5714286	0,000481286		
			0,709	984,2857143	0,000492143		

Cont. Tabla 14. Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos ligados extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de fenoles (ppm)	Masa de fenoles (g)	um/mg de fenoles	CV (%)
EEM010	1	0,0975	0,8468	1181,142857	0,000590571	6,1±0,2	3,3
			0,7965	1109,285714	0,000554643		
			0,8186	1140,857143	0,000570429		
	2	0,093	0,8747	1221	0,0006105	6,1±0,2	3,3
			0,8344	1163,428571	0,000581714		
			0,8521	1188,714286	0,000594357		
	3	0,1145	0,9556	1336,571429	0,000668286	6,3±0,1	1,6
			1,0075	1410,714286	0,000705357		
			1,0287	1441	0,0007205		
EEM028	1	0,1081	0,9559	1337	0,0006685	6,3±0,1	1,6
			0,9555	1336,428571	0,000668214		
			0,9536	1333,714286	0,000666857		
	2	0,0984	0,9149	1278,428571	0,000639214	6,3±0,1	1,6
			0,9015	1259,285714	0,000629643		
			0,9253	1293,285714	0,000646643		
	3	0,1021	0,9233	1290,428571	0,000645214	6,3±0,1	1,6
			0,9316	1302,285714	0,000651143		
			0,9246	1292,285714	0,000646143		
EEM007	1	0,1145	1,2051	1693	0,0008465	3,7±0,2	5,4
			1,2019	1688,428571	0,000844214		
			1,1586	1626,571429	0,000813286		
	2	0,1006	1,057	1481,428571	0,000740714	3,7±0,2	5,4
			0,9966	1395,142857	0,000697571		
			1,0233	1433,285714	0,000716643		
	3	0,1027	1,1189	1569,857143	0,000784929	3,7±0,2	5,4
			1,0501	1471,571429	0,000735786		
			1,0804	1514,857143	0,000757429		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Tabla 15. Datos de la cuantificación de carbohidratos no estructurales extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de carbohidratos (ppm)	Masa de carbohidratos (g)	µm/mg de Carbohidratos	CV (%)
EEM029	1	0,277	1,2	1681,428571	0,012610714		
			1,201	1682,857143	0,012621429		
			1,201	1682,857143	0,012621429		
	2	0,2614	1,09	1524,285714	0,011432143		
			1,09	1524,285714	0,011432143		
			1,09	1524,285714	0,011432143		
	3	0,2776	1,164	1630	0,012225		
			1,165	1631,428571	0,012235714		
			1,165	1631,428571	0,012235714		
EEM011	1	0,2684	1,194	1672,857143	0,012546429		
			1,195	1674,285714	0,012557143		
			1,195	1674,285714	0,012557143		
	2	0,257	0,886	1232,857143	0,009246429		
			0,887	1234,285714	0,009257143		
			0,888	1235,714286	0,009267857		
	3	0,2556	1,119	1565,714286	0,011742857		
			1,12	1567,142857	0,011753571		
			1,12	1567,142857	0,011753571		
1	0,2618	1,065	1488,571429	0,011164286			
		1,066	1490	0,011175			
		1,066	1490	0,011175			
EEM012	2	0,2649	1,112	1555,714286	0,011667857		
			1,113	1557,142857	0,011678571		
			1,113	1557,142857	0,011678571		
3	0,2432	0,998	1392,857143	0,010446429			
		0,999	1394,285714	0,010457143			
		1	1395,714286	0,010467857			
						44,5±0,8	1,8
						46,3±0,4	0,9
						43,2±0,6	1,3

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Cont. Tabla 15. Datos de la cuantificación de carbohidratos no estructurales extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de carbohidratos (ppm)	Masa de carbohidratos (g)	µm/mg de Carbohidratos	CV (%)
EEM010	1	0,2506	0,732	1012,857143	0,007596429	30,6±0,9	0,9
			0,733	1014,285714	0,007607143		
			0,733	1014,285714	0,007607143		
	2	0,2488	0,772	1070	0,008025		
			0,772	1070	0,008025		
			0,772	1070	0,008025		
	3	0,2668	0,77	1067,142857	0,008003571		
			0,77	1067,142857	0,008003571		
			0,77	1067,142857	0,008003571		
EEM028	1	0,2769	1,395	1960	0,0147	50±2	4
			1,394	1958,571429	0,014689286		
			1,394	1958,571429	0,014689286		
	2	0,2697	1,299	1822,857143	0,013671429		
			1,298	1821,428571	0,013660714		
			1,299	1822,857143	0,013671429		
	3	0,2631	1,239	1737,142857	0,013028571		
			1,24	1738,571429	0,013039286		
			1,24	1738,571429	0,013039286		
EEM007	1	0,2603	0,735	1017,142857	0,007628571	29,8±0,6	2
			0,735	1017,142857	0,007628571		
			0,735	1017,142857	0,007628571		
	2	0,2525	0,717	991,4285714	0,007435714		
			0,717	991,4285714	0,007435714		
			0,717	991,4285714	0,007435714		
	3	0,2489	0,732	1012,857143	0,007596429		
			0,732	1012,857143	0,007596429		
			0,733	1014,285714	0,007607143		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Tabla 16. Datos de la cuantificación de carbohidratos no estructurales extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi.húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de carbohidratos (ppm)	Masa de carbohidratos (g)	µm/mg de Carbohidratos	CV (%)
EEM029	1	0,2579	0,871	1211,428571	0,009085714	34,8±0,3	0,9
				1211,428571	0,009085714		
				1211,428571	0,009085714		
	2	0,2757	0,912	1270	0,009525		
				1270	0,009525		
				1270	0,009525		
	3	0,2485	0,826	1147,142857	0,008603571		
				1147,142857	0,008603571		
				1147,142857	0,008603571		
EEM011	1	0,2619	0,601	825,7142857	0,006192857	23,6±0,5	2,1
				825,7142857	0,006192857		
				825,7142857	0,006192857		
	2	0,274	0,61	838,5714286	0,006289286		
				838,5714286	0,006289286		
				838,5714286	0,006289286		
	3	0,2574	0,604	830	0,006225		
				830	0,006225		
				828,5714286	0,006214286		
EEM012	1	0,2711	0,782	1085,714286	0,008142857	30,9±0,9	2,9
				1084,285714	0,008132143		
				1084,285714	0,008132143		
	2	0,2529	0,772	1070	0,008025		
				1070	0,008025		
				1070	0,008025		
	3	0,2452	0,831	1154,285714	0,008657143		
				1154,285714	0,008657143		
				1154,285714	0,008657143		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Cont. Tabla 16. Datos de la cuantificación de carbohidratos no estructurales extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi.húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de carbohidratos (ppm)	Masa de carbohidratos (g)	µm/mg de Carbohidratos	CV (%)
EEM010	1	987,1428571			0,007403571		
		0,2542	0,714		0,007403571		
		987,1428571			0,007403571		
	2	1010			0,007575		
		0,2472	0,73		0,007575	29±1	3,4
		1010			0,007575		
	3	922,8571429			0,006921429		
		0,247	0,669		0,006921429		
		922,8571429			0,006921429		
EEM028	1	955,7142857			0,007167857		
		0,2644	0,692		0,007167857		
		955,7142857			0,007167857		
	2	922,8571429			0,006921429		
		0,26	0,67		0,006932143	27,2±0,5	1,8
		922,8571429			0,006921429		
	3	1001,428571			0,007510714		
		0,2689	0,724		0,007510714		
		1001,428571			0,007510714		
EEM007	1	931,4285714			0,006985714		
		0,2469	0,675		0,006985714		
		931,4285714			0,006985714		
	2	948,5714286			0,007114286		
		0,2569	0,687		0,007114286	27,2±0,12	0,4
		948,5714286			0,007114286		
	3	848,5714286			0,006364286		
		0,2483	0,617		0,006364286		
		848,5714286			0,006364286		

Tabla 17. Datos de la cuantificación de carbohidratos no estructurales extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de carbohidratos (ppm)	Masa de carbohidratos (g)	µm/mg de Carbohidratos	CV (%)
EEM029	1	0,2696	0,914	1272,857143	0,009546429	36±1	2,8
			0,914	1272,857143	0,009546429		
			0,914	1272,857143	0,009546429		
	2	0,2622	0,901	1254,285714	0,009407143	36±1	2,8
			0,901	1254,285714	0,009407143		
			0,902	1255,714286	0,009417857		
	3	0,2406	0,886	1232,857143	0,009246429	36±1	2,8
			0,886	1232,857143	0,009246429		
			0,886	1232,857143	0,009246429		
EEM011	1	0,2629	1,412	1984,285714	0,014882143	57±1	1,8
			1,412	1984,285714	0,014882143		
			1,413	1985,714286	0,014892857		
	2	0,2518	1,406	1975,714286	0,014817857	57±1	1,8
			1,406	1975,714286	0,014817857		
			1,406	1975,714286	0,014817857		
	3	0,2666	1,437	2020	0,01515	57±1	1,8
			1,437	2020	0,01515		
			1,436	2018,571429	0,015139286		
EEM012	1	0,2423	1,16	1624,285714	0,012182143	49,5±0,6	1,2
			1,161	1625,714286	0,012192857		
			1,161	1625,714286	0,012192857		
	2	0,2405	1,125	1574,285714	0,011807143	49,5±0,6	1,2
			1,125	1574,285714	0,011807143		
			1,125	1574,285714	0,011807143		
	3	0,257	1,202	1684,285714	0,012632143	49,5±0,6	1,2
			1,201	1682,857143	0,012621429		
			1,2	1681,428571	0,012610714		

Cont. Tabla 17. Datos de la cuantificación de carbohidratos no estructurales extraídos del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de carbohidratos (ppm)	Masa de carbohidratos (g)	µm/mg de Carbohidratos	CV (%)
EEM010	1	0,2758	1,5	2110	0,015825	56±1	1,8
			1,5	2110	0,015825		
			1,5	2110	0,015825		
	2	0,2573	1,355	1902,857143	0,014271429		
			1,354	1901,428571	0,014260714		
			1,354	1901,428571	0,014260714		
	3	0,2558	1,33	1867,142857	0,014003571		
			1,33	1867,142857	0,014003571		
			1,33	1867,142857	0,014003571		
EEM028	1	0,2605	1,381	1940	0,01455	56,0±0,2	0,4
			1,38	1938,571429	0,014539286		
			1,38	1938,571429	0,014539286		
	2	0,2708	1,435	2017,142857	0,015128571		
			1,435	2017,142857	0,015128571		
			1,435	2017,142857	0,015128571		
	3	0,2418	1,295	1817,142857	0,013628571		
			1,294	1815,714286	0,013617857		
			1,294	1815,714286	0,013617857		
EEM007	1	0,2544	1,386	1947,142857	0,014603571	59±2	3,4
			1,389	1951,428571	0,014635714		
			1,389	1951,428571	0,014635714		
	2	0,2526	1,451	2040	0,0153		
			1,451	2040	0,0153		
			1,451	2040	0,0153		
	3	0,2479	1,667	2348,571429	0,017614286		
			1,667	2348,571429	0,017614286		
			1,667	2348,571429	0,017614286		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Tabla 18. Datos de la cuantificación de prolina libre extraída del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de prolina (ppm)	Masa de prolina (g)	$\mu\text{m/mg}$ de Prolina	CV (%)
EEM029	1	0,277	0,908	33,05	0,000247875		
		0,277	0,909	33,1	0,00024825		
		0,277	0,909	33,1	0,00024825		
	2	0,2614	0,896	32,45	0,000243375		
		0,2614	0,896	32,45	0,000243375	0,91±0,02	2,2
		0,2614	0,897	32,5	0,00024375		
	3	0,2776	0,921	33,7	0,00025275		
		0,2776	0,922	33,75	0,000253125		
		0,2776	0,922	33,75	0,000253125		
EEM011	1	0,2684	1,19	47,15	0,000353625		
		0,2684	1,193	47,3	0,00035475		
		0,2684	1,193	47,3	0,00035475		
	2	0,257	1,153	45,3	0,00033975		
		0,257	1,153	45,3	0,00033975	1,33±0,01	0,8
		0,257	1,153	45,3	0,00033975		
	3	0,2556	1,164	45,85	0,000343875		
		0,2556	1,163	45,8	0,0003435		
		0,2556	1,164	45,85	0,000343875		
EEM012	1	0,2618	1,088	42,05	0,000315375		
		0,2618	1,087	42	0,000315		
		0,2618	1,087	42	0,000315		
	2	0,2649	1,102	42,75	0,000320625		
		0,2649	1,102	42,75	0,000320625	1,20±0,01	0,8
		0,2649	1,102	42,75	0,000320625		
	3	0,2432	1,012	38,25	0,000286875		
		0,2432	1,012	38,25	0,000286875		
		0,2432	1,013	38,3	0,00028725		

Cont. Tabla 18. Datos de la cuantificación de prolina libre extraída del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbacia	Concentración de prolina (ppm)	Masa de prolina (g)	$\mu\text{m}/\text{mg}$ de Prolina	CV (%)
EEM010	1	0,2506	0,989	37,1	0,00027825		
		0,2506	0,99	37,15	0,000278625		
		0,2506	0,99	37,15	0,000278625		
	2	0,2488	0,982	36,75	0,000275625		
		0,2488	0,982	36,75	0,000275625		1,11±0,02
		0,2488	0,982	36,75	0,000275625		1,8
	3	0,2668	1,002	37,75	0,000283125		
		0,2668	1,04	39,65	0,000297375		
		0,2668	1,056	40,45	0,000303375		
EEM028	1	0,2769	1,267	51	0,0003825		
		0,2769	1,263	50,8	0,000381		
		0,2769	1,254	50,35	0,000377625		
	2	0,2697	1,129	44,1	0,00033075		
		0,2697	1,13	44,15	0,000331125		1,26±0,09
		0,2697	1,131	44,2	0,0003315		7,1
	3	0,2631	1,077	41,5	0,00031125		
		0,2631	1,078	41,55	0,000311625		
		0,2631	1,078	41,55	0,000311625		
EEM007	1	0,2603	1,085	41,9	0,00031425		
		0,2603	1,085	41,9	0,00031425		
		0,2603	1,085	41,9	0,00031425		
	2	0,2525	1,104	42,85	0,000321375		
		0,2525	1,104	42,85	0,000321375		1,26±0,04
		0,2525	1,104	42,85	0,000321375		3,2
	3	0,2489	1,113	43,3	0,00032475		
		0,2489	1,113	43,3	0,00032475		
		0,2489	1,113	43,3	0,00032475		

Tabla 19. Datos de la cuantificación de prolina libre extraída del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi-húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de prolina (ppm)	Masa de prolina (g)	$\mu\text{m/mg}$ de Prolina	CV (%)
EEM029	1	0,2579	0,529	14,1	0,00010575	0,40±0,01	2,5
			0,529	14,1	0,00010575		
			0,529	14,1	0,00010575		
	2	0,2757	0,541	14,7	0,00011025		
			0,543	14,8	0,000111		
			0,544	14,85	0,00011375		
	3	0,2485	0,499	12,6	0,0000945		
			0,499	12,6	0,0000945		
			0,497	12,5	0,00009375		
EEM011	1	0,2619	0,634	19,35	0,000145125	0,522±0,003	0,5
			0,634	19,35	0,000145125		
			0,634	19,35	0,000145125		
	2	0,274	0,652	20,25	0,000151875		
			0,652	20,25	0,000151875		
			0,65	20,15	0,000151125		
	3	0,2574	0,621	18,7	0,00014025		
			0,625	18,9	0,00014175		
			0,625	18,9	0,00014175		
EEM012	1	0,2711	0,43	9,15	0,000068625	0,24±0,01	4,2
			0,437	9,5	0,00007125		
			0,439	9,6	0,000072		
	2	0,2529	0,404	7,85	0,000058875		
			0,404	7,85	0,000058875		
			0,404	7,85	0,000058875		
	3	0,2452	0,402	7,75	0,000058125		
			0,402	7,75	0,000058125		
			0,402	7,75	0,000058125		

Cont. Tabla 19. Datos de la cuantificación de prolina libre extraída del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi-húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de prolina (ppm)	Masa de prolina (g)	$\mu\text{m/mg}$ de Prolina	CV (%)
EEM010	1	0,2542	1,101	42,7	0,00032025	1,20 \pm 0,06	5
			1,116	43,45	0,000325875		
			1,116	43,45	0,000325875		
	2	0,2472	1,007	38	0,000285		
			1,007	38	0,000285		
			1,006	37,95	0,000284625		
	3	0,247	1,02	38,65	0,000289875		
			1,028	39,05	0,000292875		
			1,02	38,65	0,000289875		
EEM028	1	0,2644	0,851	30,2	0,0002265	0,86 \pm 0,04	4,7
			0,84	29,65	0,000222375		
			0,851	30,2	0,0002265		
	2	0,26	0,875	31,4	0,0002355		
			0,876	31,45	0,000235875		
			0,877	31,5	0,00023625		
	3	0,2689	0,825	28,9	0,00021675		
			0,83	29,15	0,000218625		
			0,83	29,15	0,000218625		
EEM007	1	0,2469	1,011	38,2	0,0002865	1,16 \pm 0,02	1,7
			1,01	38,15	0,000286125		
			1,012	38,25	0,000286875		
	2	0,2569	1,022	38,75	0,000290625		
			1,022	38,75	0,000290625		
			1,022	38,75	0,000290625		
	3	0,2483	1,033	39,3	0,00029475		
			1,033	39,3	0,00029475		
			1,033	39,3	0,00029475		

Tabla 20. Datos de la cuantificación de prolina libre extraída del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de prolina (ppm)	Masa de prolina (g)	µm/mg de Prolina	CV (%)
EEM029	1	0,2696	0,6325	19,275	0,000144563	0,55±0,01	1,8
			0,6325	19,275	0,000144563		
			0,6325	19,275	0,000144563		
	2	0,2622	0,635	19,4	0,0001455		
			0,635	19,4	0,0001455		
			0,635	19,4	0,0001455		
	3	0,2406	0,598	17,55	0,000131625		
			0,598	17,55	0,000131625		
			0,598	17,55	0,000131625		
EEM011	1	0,2629	0,59	17,15	0,000128625	0,49±0,02	4,1
			0,591	17,2	0,000129		
			0,591	17,2	0,000129		
	2	0,2518	0,593	17,3	0,00012975		
			0,593	17,3	0,00012975		
			0,594	17,35	0,000130125		
	3	0,2666	0,586	16,95	0,000127125		
			0,582	16,75	0,000125625		
			0,589	17,1	0,00012825		
EEM012	1	0,2423	0,725	23,9	0,00017925	0,73±0,02	2,7
			0,725	23,9	0,00017925		
			0,723	23,8	0,0001785		
	2	0,2405	0,696	22,45	0,000168375		
			0,696	22,45	0,000168375		
			0,696	22,45	0,000168375		
	3	0,257	0,755	25,4	0,0001905		
			0,755	25,4	0,0001905		
			0,755	25,4	0,0001905		

Cont. Tabla 20. Datos de la cuantificación de prolina libre extraída del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbacia	Concentración de prolina (ppm)	Masa de prolina (g)	µm/mg de Prolina	CV (%)
EEM010	1	0,2758	0,568	16,05	0,000120375	0,45±0,01	2,2
			0,575	16,4	0,000123		
			0,578	16,55	0,000124125		
	2	0,2573	0,556	15,45	0,000115875		
			0,564	15,85	0,000118875		
			0,556	15,45	0,000115875		
	3	0,2558	0,553	15,3	0,00011475		
			0,553	15,3	0,00011475		
			0,554	15,35	0,000115125		
EEM028	1	0,2605	0,607	18	0,000135	0,53±0,02	3,8
			0,608	18,05	0,000135375		
			0,608	18,05	0,000135375		
	2	0,2708	0,646	19,95	0,000149625		
			0,646	19,95	0,000149625		
			0,645	19,9	0,00014925		
	3	0,2418	0,575	16,4	0,000123		
			0,575	16,4	0,000123		
			0,576	16,45	0,000123375		
EEM007	1	0,2544	0,981	36,7	0,00027525	1,07±0,03	2,8
			0,981	36,7	0,00027525		
			0,982	36,75	0,000275625		
	2	0,2526	0,99	37,15	0,000278625		
			0,99	37,15	0,000278625		
			0,99	37,15	0,000278625		
	3	0,2479	0,929	34,1	0,00025575		
			0,929	34,1	0,00025575		
			0,928	34,05	0,000255375		

Tabla 21. Datos de la cuantificación de ligninas extraídas del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque húmedo tropical (localidad Padrón Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de ligninas (ppm)	Masa de lignina (g)	µg/mg de ligninas	CV (%)
EEM029	1	0,0963	0,451	125	0,00125		
	2	0,1045	0,459	127,5	0,001275	12,2±0,7	5,7
	3	0,1107	0,46	127,8125	0,001278125		
EEM011	1	0,1063	0,62	177,8125	0,001778125		
	2	0,1007	0,603	172,5	0,001725	16,4±0,4	5,4
	3	0,1166	0,625	179,375	0,00179375		
EEM012	1	0,1029	0,436	120,3125	0,001203125		
	2	0,0975	0,412	112,8125	0,001128125	11,4±0,4	3,5
	3	0,1026	0,408	111,5625	0,001115625		
EEM010	1	0,0975	0,91	268,4375	0,002684375		
	2	0,093	0,906	267,1875	0,002671875	29±1	3,5
	3	0,1145	1,132	337,8125	0,003378125		
EEM028	1	0,1081	0,819	240	0,0024		
	2	0,0984	0,841	246,875	0,00246875	23,8±1,5	6
	3	0,1021	0,84	246,5625	0,002465625		
EEM007	1	0,1145	0,983	291,25	0,0029125		
	2	0,1006	0,9	265,3125	0,002653125	27±2	6,6
	3	0,1027	1,004	297,8125	0,002978125		

Tabla 22. Datos de la cuantificación de ligninas extraídas del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque semi-húmedo tropical (localidad Tesoro Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de ligninas (ppm)	Masa de lignina (g)	µg/mg de ligninas	CV (%)
EEM029	1	0,1033	0,498	139,6875	0,001396875	13,8±0,3	2,2
	2	0,0998	0,494	138,4375	0,001384375		
	3	0,1209	0,594	169,6875	0,001696875		
EEM011	1	0,1124	0,522	147,1875	0,001471875	12,7±0,6	4,7
	2	0,1001	0,264	66,5625	0,000665625		
	3	0,1196	0,519	146,25	0,0014625		
EEM012	1	0,0979	0,3	77,8125	0,000778125	12,0±0,1	0,8
	2	0,1095	0,474	132,1875	0,001321875		
	3	0,1049	0,451	125	0,00125		
EEM010	1	0,1028	0,533	150,625	0,00150625	14,5±0,5	3,4
	2	0,104	0,513	144,375	0,00144375		
	3	0,0982	0,517	145,625	0,00145625		
EEM028	1	0,1032	1,549	468,125	0,00468125	44±2	4,6
	2	0,1032	0,486	135,9375	0,001359375		
	3	0,1125	1,581	478,125	0,00478125		
EEM007	1	0,1073	0,915	270	0,0027	23,4±1,6	6,9
	2	0,0973	0,764	222,8125	0,002228125		
	3	0,094	0,715	207,5	0,002075		

Los datos sombreados no fueron tomados en cuenta para calcular el promedio de los µg/mg de fenoles solubles ya que estos se encuentran alejados de la media de los valores obtenidos.

Tabla 23. Datos de la cuantificación de ligninas extraídas del material foliar de los clones de *Theobroma cacao* L. procedentes del bosque seco tropical (localidad Tacariguita Edo. Miranda).

Nombre del clon	Número de réplica	Masa de la réplica (g)	Absorbancia	Concentración de ligninas (ppm)	Masa de lignina (g)	µg/mg de ligninas	CV (%)
EEM029	1	0,0999	0,32	84,0625	0,000840625	8,5±0,4	4,7
	2	0,0956	0,325	85,625	0,00085625		
	3	0,1001	0,315	82,5	0,000825		
EEM011	1	0,1063	0,339	90	0,0009	8,2±0,3	3,7
	2	0,0989	0,317	83,125	0,00083125		
	3	0,1033	0,311	81,25	0,0008125		
EEM012	1	0,1028	0,252	62,8125	0,000628125	6,0±0,3	5
	2	0,1017	0,256	64,0625	0,000640625		
	3	0,1013	0,236	57,8125	0,000578125		
EEM010	1	0,1046	0,432	119,0625	0,001190625	11,8±0,4	3,4
	2	0,114	0,487	136,25	0,0013625		
	3	0,1131	0,487	136,25	0,0013625		
EEM028	1	0,1047	0,308	80,3125	0,000803125	7,3±0,3	4
	2	0,1008	0,283	72,5	0,000725		
	3	0,1049	0,286	73,4375	0,000734375		
EEM007	1	0,1136	0,388	105,3125	0,001053125	9,3±0,2	2
	2	0,1126	0,381	103,125	0,00103125		
	3	0,109	0,386	104,6875	0,001046875		