# **Caracterización fisicoquímica y funcional para identificar clones élite de cacao (*Theobroma cacao l*.) en tres zonas productoras de Colombia**

## Análisis de resultados

Estadísticas descriptivas de los datos

Objetivo 1

Los cambios en la composición del cotiledón pre y post fermentación de los granos de cacao, se evaluaron en función de las siguientes variables: contenido de aceite, ácidos grasos, fenoles totales y contenido de catequina y epicatequina.

Para este fin se evaluó el supuesto de normalidad en cada una de las variables en su estado pre y posterior a la fermentación a través del test de Shapiro-Wilks, dando como resultado el rechazo de la hipótesis de normalidad en todos los casos; por consiguiente, no es apropiado usar test paramétricos (t-student, ANOVA,…) para la comparación de medias y verificación de diferencias significativas.

En este sentido fue necesario hacer las comparaciones con test no paramétricos como Wilcoxon y Kruskal-Wallis los cuales están exentos del supuesto de normalidad en los datos. Teniendo en cuenta la falta de independencia en las observaciones, por efecto del método de siembra y la ubicación espacial de los cultivos, se desarrolló el siguiente esquema de análisis para garantizar una pseudo-independencia de las observaciones:

1. Selección aleatoria de una sub-muestra (aplicando muestreo sin reemplazo) del 80% de la muestra original.
2. Aplicación del test no paramétrico de interés (Wilcoxon y/o Kruskal-Wallis) sobre la sub-muestra, comparando los datos registrados pre y post fermentación para cada variable.
3. Extracción del p-valor para el test calculado.
4. Repetir los 3 pasos anteriores 10.000 veces.
5. Con los 10.000 p-valores obtenidos evaluar los percentiles 5% y 95% de la distribución generada para determinar con precisión el p-valor real con el fin de contrastar la hipótesis nula de interés a un nivel de significancia de α = 0.05.

Para comparar el cambio en la composición del cotiledón en función de las variables medidas, se planteó la hipótesis nula en la cual no existen diferencias entre los registros medidos antes de la fermentación y después de la misma. Como hipótesis alternativa se evaluó si existen diferencias significativas, bien sean estas en términos de pérdida o ganancia.

Para esto se ejecutaron test de Wilcoxon sobre todas las observaciones sin tener en consideración el tipo de clon y la zona de acuerdo la metodología propuesta. Posteriormente, se evaluaron diferencias significativas inducidas por la zona con el test de Kruskal-Wallis y finalmente se concluyó sí existían diferencias significativas por clon y zona con un análisis descriptivo.

A continuación los resultados obtenidos. Para la variable contenido de aceite en la Figura 1, se muestran los datos obtenidos para los clones/repeticiones diferenciados por sus mediciones previas y posteriores al proceso de fermentación. Como se observa en todos los casos, el contenido de aceite es superior previo al proceso de fermentación que posterior al mismo.

|  |  |
| --- | --- |
| *Figura 1. Contenido de aceite pre y post fermentación* | *Figura 2. Distribución de p-valores para el test de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas en el contenido de aceite* |

Ahora, para evaluar si las diferencias entre todos los clones para granos frescos y fermentados a nivel general son significativas, se realizaron test de Wilcoxon de acuerdo al esquema propuesto, dando como resultado la distribución del valor-p para el test (Figura 2), donde se evidencia la existencia de diferencias significativas entre los dos momentos de tiempo evaluados (p-valores ≈ 0).

Acto seguido, se exploraron las diferencias en el contenido de aceite entre zonas sin tener en cuenta el tipo de clon, inicialmente de forma descriptiva tal como se muestra en la Figura 3. Como se puede observar existe un comportamiento diferencial por zonas, destacándose las muestras tomadas en Arauca las cuales presentan las diferencias en contenido de aceite más altas respecto a los departamentos de Huila y Santander. No obstante, existen 3 registros en el departamento de Santander que son los que presentan perdidas más altas, incluso por encima de los 20 [unidades] en el contenido de aceite.

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 3. Diferencia en el contenido de aceite por zonas | Figura 4. Distribución de p-valores para el test de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas en el Contenido de aceite por zona |

Luego para determinar si dichas diferencias observadas son estadísticamente significativas se realizó el test de Kruskal-Wallis dando como resultado p-valores próximos a cero, lo que indica que existen diferencias significativas entre zonas (Figura 4).

Finalmente se exploraron las diferencias entre zonas y clones para determinar si existe un efecto de interacción. Como se observa en la Figura 5, algunos clones presentan pérdidas o ganancias diferenciadas por zona. Un caso a destacar es el clon FLE 3, que para la región de Arauca exhibe una pérdida de 10 [unidades], mientras para la región del Huila se observan diferencias próximas a cero y finalmente para Santander se presentan pérdidas por encima de las 20 [unidades]. Clones como SCC 80, FLE 3 y FEAR 5 en el departamento del Huila no muestran cambios significativos en el contenido de aceite (diferencias cercanas a cero o por debajo). Los demás clones muestran comportamientos diferenciados en cuanto a diferencias en el contenido de aceite.

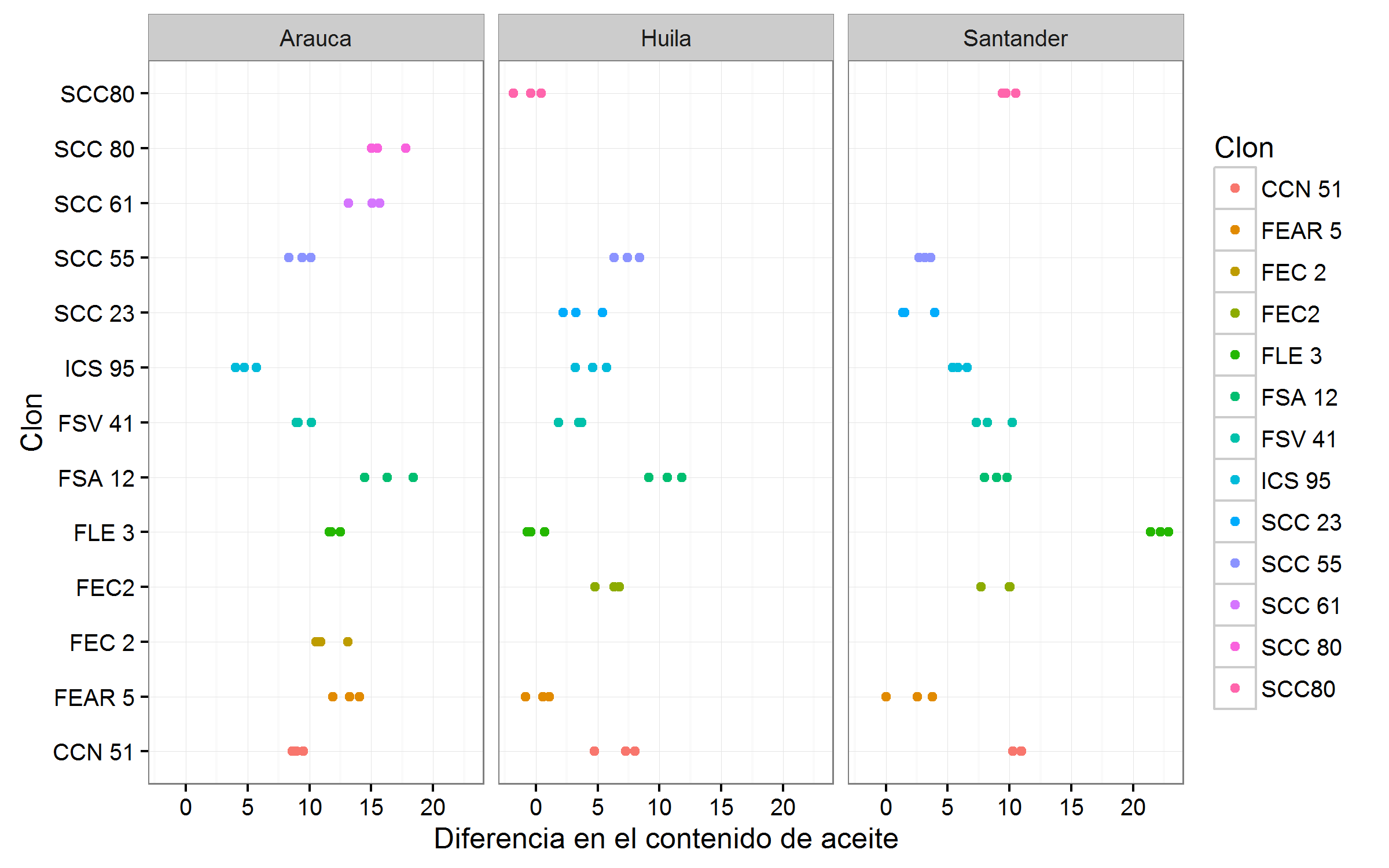


Figura 5. Diferencia en el contenido de aceite por zona y clon

Prosiguiendo con el análisis, se exploraron los cambios en la composición del cotiledón en función de los fenoles totales[[1]](#footnote-1). Como se observa en la Figura 6, a diferencia del contenido de aceite, no existe un patrón claro del contenido de fenoles totales pre y post fermentación, aunque se observa una amplia variación en los datos. Luego, para determinar si existen diferencias significativas se procedió a la ejecución del test de Wilcoxon.

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 6. Fenoles totales pre y post fermentación | Figura 7. Distribución de p-valores para el test de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas en el contenido de fenoles totales |

En la Figura 7 se observa la distribución de p-valores, los cuales se encuentran en un rango de 0.1 a 1, lo que indica que para un nivel de significancia del 5% no existen diferencias significativas entre el conteo de fenoles pre y post fermentación (Intervalo del 90% de confianza para p-valores: [0.36, 0.98]). Acto seguido se evaluaron las diferencias por zona.

Como se observa en la Figura 8, parece no presentarse un comportamiento diferencial producido por la zona, aquí se puede observar como las diferencias oscilan alrededor de 0 independientemente de la zona que se evalúe.

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 8. Diferencia en el contenido de fenoles totales por zonas | Figura 9. Distribución de p-valores para el test de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas en el contenido de fenoles totales por zona |

Para evaluar las diferencias entre zonas se aplicó el test de Kruskal-Wallis encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las zonas (Intervalo del 90% de confianza para p-valores: [0.43, 0.98]) (ver Figura 9).

Analizando la Figura 10, clones como CCN 51, FEAR 5, FLE 3, FSA 12, SCC 23 y SCC80 presentan diferencias próximas a cero, lo que indica un cambio no significativo en términos pre y post fermentación. Por el contrario el clon ICS 95 presenta una pérdida de 10 [unidades] en los tres ambientes evaluados. Mientras el clon SCC 55 presenta incrementos del orden de 15 a 20 [unidades] en los ambientes de Arauca y Huila específicamente.

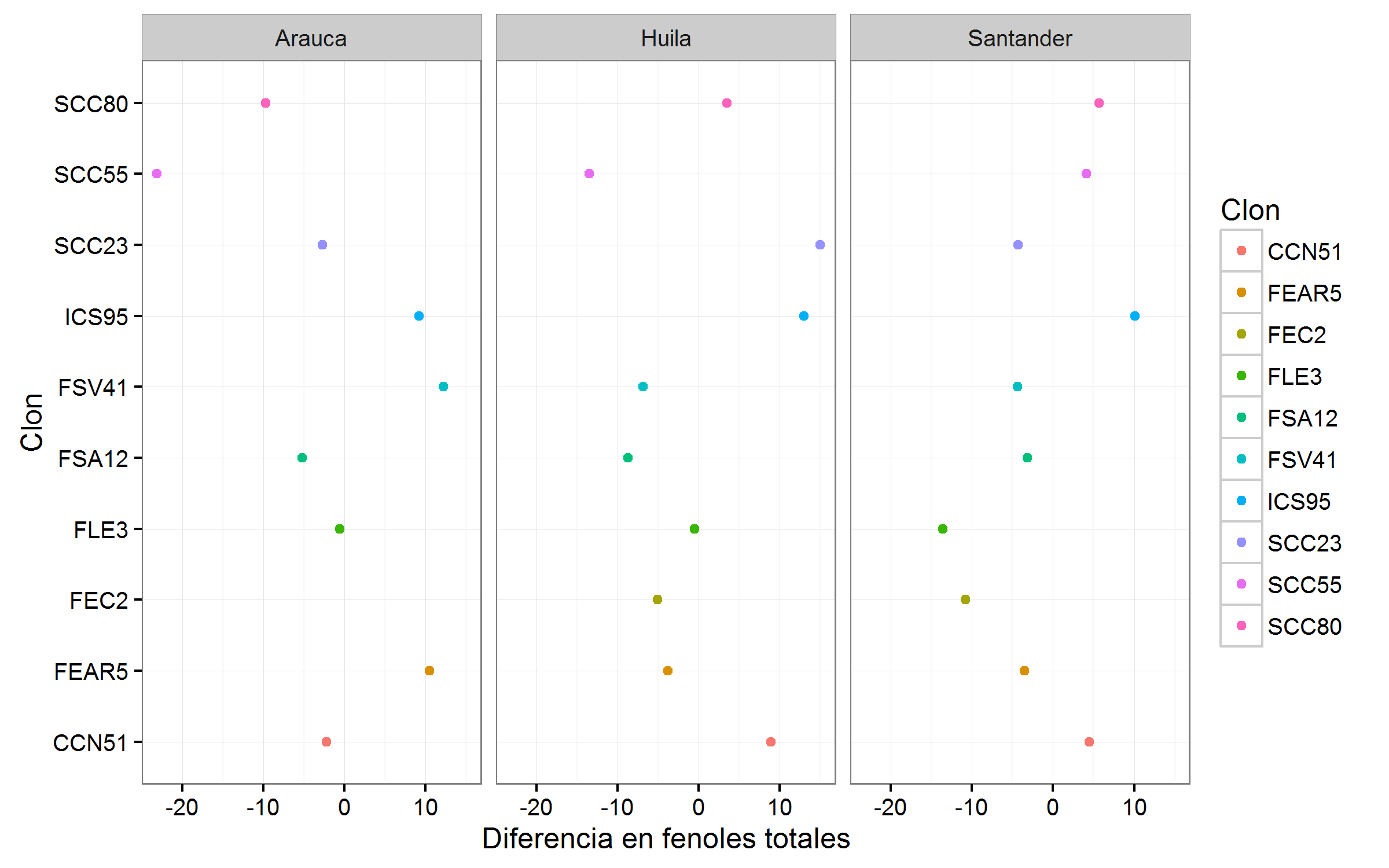


Figura 10. Diferencia en el contenido de fenoles totales por zona y clon

Prosiguiendo con el análisis, se evaluaron los cambios en términos de ácidos grasos siguiendo la misma metodología. De este modo, iniciando con el ácido palmítico se procedió a verificar si existían diferencias significativas entre las mediciones pre y posteriores a fermentación sin considerar clon y/o zona, llegando a la conclusión que no existen diferencias significativas para esta variable en consideración (Intervalo del 90% de confianza para p-valores [0.41, 0.96]) (ver Figuras 11 y 12).

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 11. Ácido palmítico pre y post fermentación | Figura 12. Distribución de p-valores para el test de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas en el ácido palmítico |

Explorando ahora si existen diferencias significativas entre las zonas donde se evaluaron los diferentes clones, si se observa la Figura 13 se puede notar unas leves diferencias entre las zonas evaluadas (aunque alrededor de 0), no obstante al realizar el test de Kruskal-Wallis para la verificación de la hipótesis de diferencias entre zonas se obtuvo un rango de p-valores [0.06, 0.71] con una alta tendencia a presentar un p-valor alrededor de 0.2 (Figura 14), con el cual no se podría verificar la existencia de diferencias significativas.

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 13. Diferencia en ácido palmítico por zona | Figura 14. Distribución de p-valores para el test de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas en el ácido palmítico por zona |

Finalmente analizando la Figura 15, se observa que para casi todas las combinaciones clon/ambiente, los ligeros cambios oscilan alrededor de cero, lo que no indica ningún cambio posterior al proceso de fermentación para el ácido palmítico.

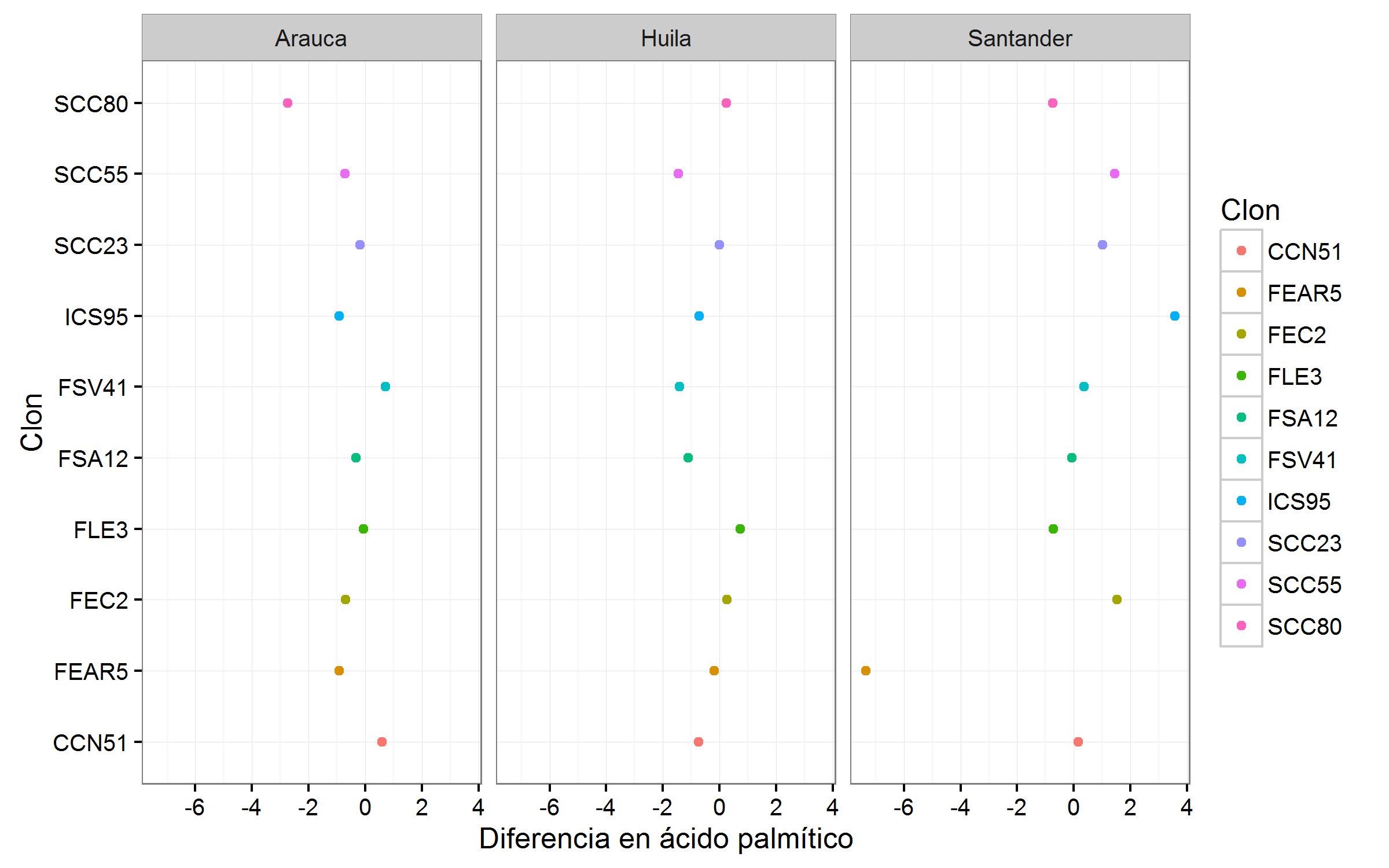


Figura 15. Diferencia en ácido palmítico por zona y clon

En términos del ácido esteárico, aunque se observa una mayor variabilidad en los datos (ver Figura 16), al realizar el test de Wilcoxon para verificar si existen diferencias entre la etapa previa y posterior a la fermentación se logró verificar que no existen diferencias significativas (p-valores, intervalo del 90% [0.33, 0.94]).

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 16. Ácido esteárico pre y post fermentación | Figura 17. Distribución de p-valores para el test de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas en el ácido esteárico |

Acto seguido, evaluando si existen diferencias entre zonas (Figura18), el test de Kruskal-Wallis indica que la distribución de p-valores oscila en un intervalo de [0.44, 0.99] para un 90% de las veces, por ende se descartan diferencias entre zonas.

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 18. Diferencia en ácido esteárico por zona | Figura 19. Distribución de p-valores para el test de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas en el ácido esteárico por zona |

Ahora, explorando las diferencias por clon/zona, en la Figura 20 se puede notar que la mayoría de clones presentan variaciones alrededor de 0 lo que índica cambios nulos, sin embargo, clones como SCC 80, ICS 95 y FEAR 5 muestran fuertes variaciones dependiendo de la zona.

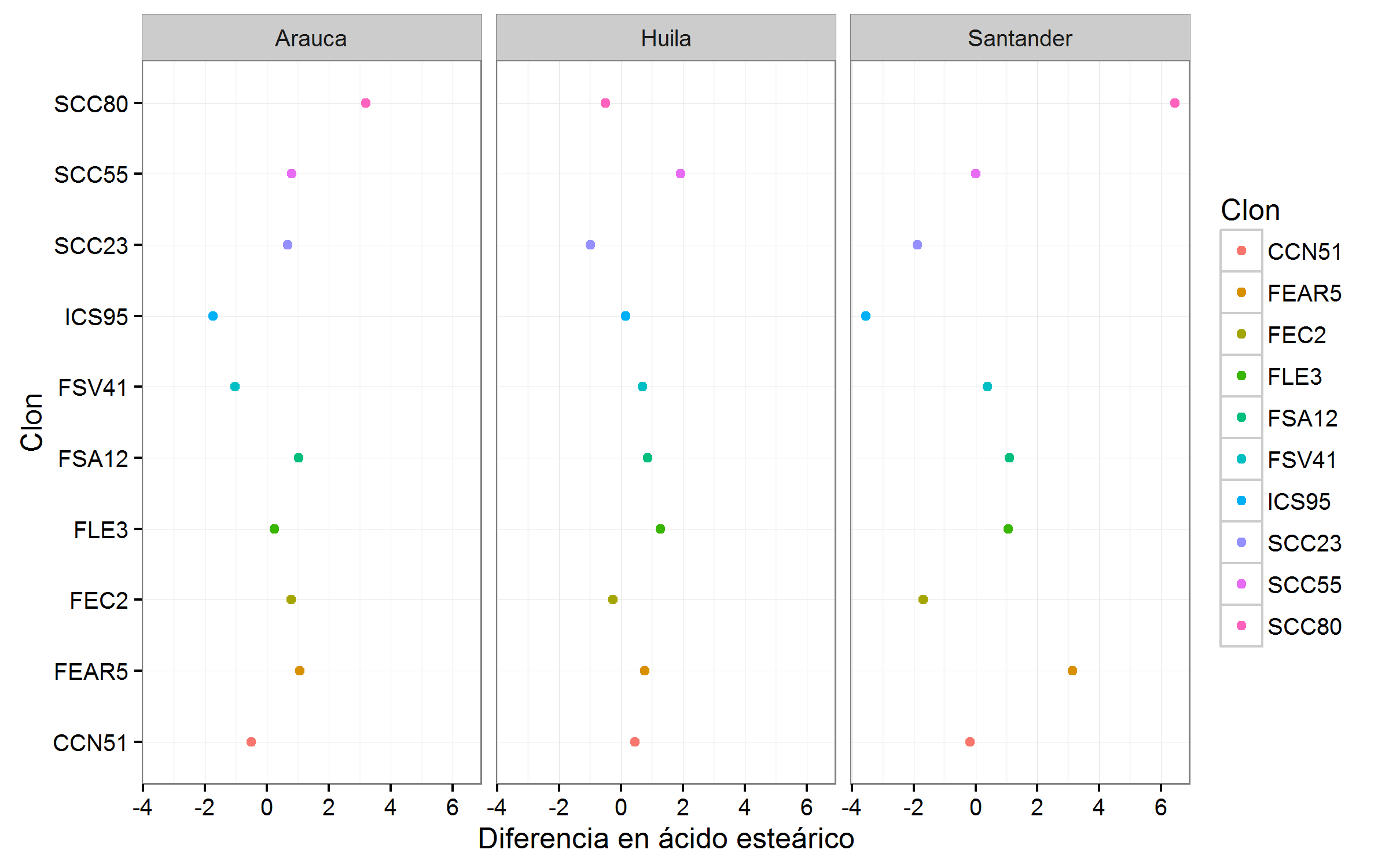


Figura 20. Diferencia en ácido esteárico por zona y clon

Continuando con el proceso, a continuación se examinaron los cambios relacionados con el ácido oleico, el cual presenta baja variación y el test de Wilcoxon, permite concluir que no existen diferencias significativas entre las mediciones pre y post fermentación (p-valores, intervalo 90% [0.52, 0.99]).

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 21. Ácido oleico pre y post fermentación | Figura 22. Distribución de p-valores para el test de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas en el ácido oleico |

Por otro lado, al explorar la relación que podría tener la zona sobre el contenido de ácido oleico (ver Figuras 23 y 24) se encontró que bien podría existir una diferenciación por zona pero muy débil (distribución de p-valores: [0.03, 0.50]).

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 23. Diferencia en ácido oleico por zona | Figura 24. Distribución de p-valores para el test de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas en el ácido oleico por zona |

Luego contrastando las diferencias a nivel clon/zona, se tienen que aunque la mayoría de diferencias oscila alrededor de 0, algunos clones muestran un comportamiento diferencial por zona, tales como ICS 95, FL 3 y FEAR 5.

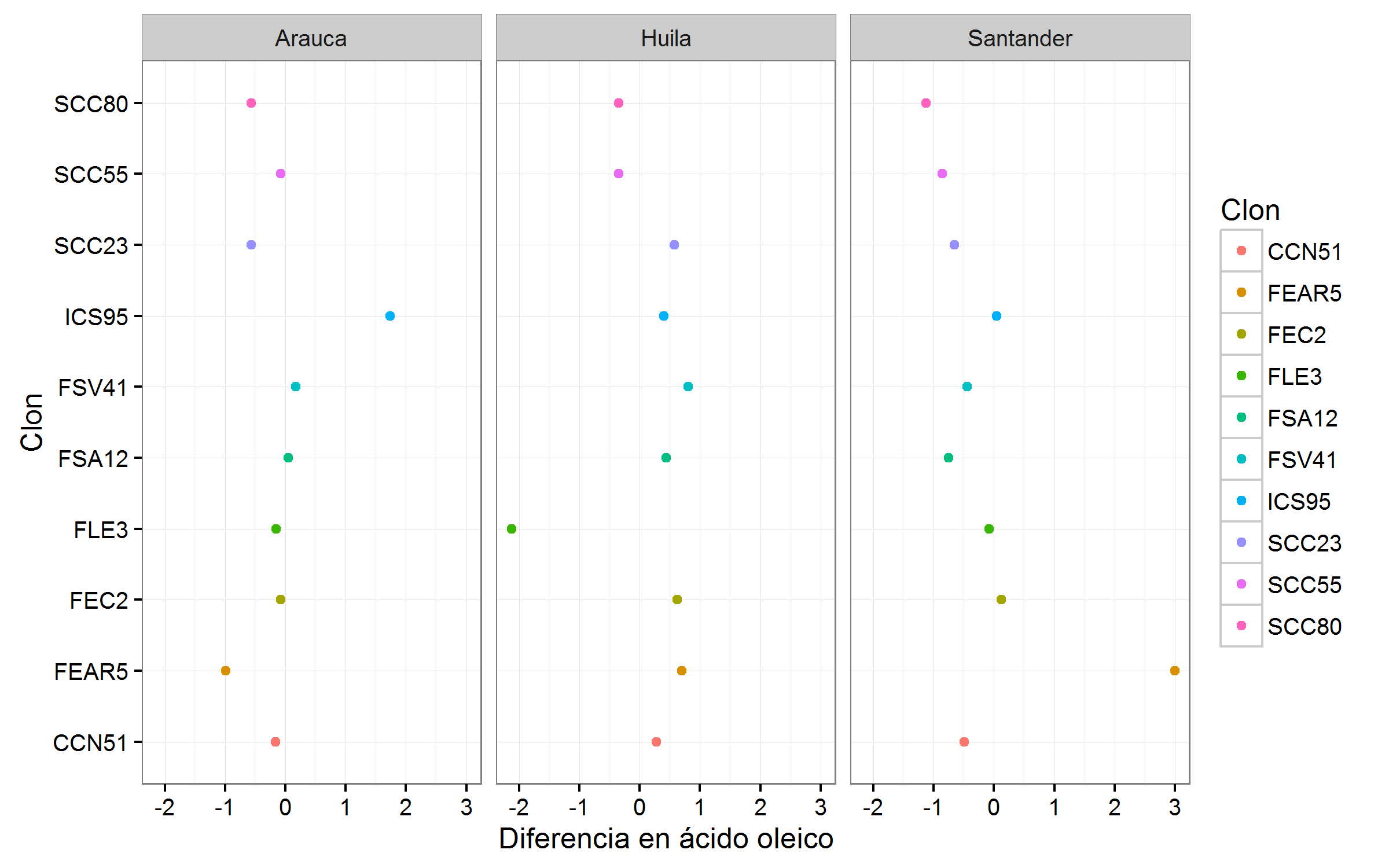


Figura 25. Diferencia en ácido oleico por zona y clon

Finalmente evaluando las diferencias en el contenido de ácido linoleico de manera general, se tiene que las diferencias observadas no son estadísticamente significativas, por tanto no se puede concluir que haya diferenciación alguna entre el contenido de ácido linoleico pre y post fermentación (ver Figuras 26 y 27. Para la Figura 27, el intervalo del 90% de confianza muestra que los p-valores del test de Wilcoxon oscilan entre [0.47, 0.96], por tanto no se puede rechazar la hipótesis nula de igual en las mediciones para los dos tiempos evaluados).

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 26. Ácido linoleico pre y post fermentación | Figura 27. Distribución de p-valores para el test de Wilcoxon para evaluar diferencias significativas en el ácido linoleico |

Nuevamente evaluando si existen diferencias entre las zonas (Figura 28), las simulaciones del test Kruskal-Wallis arrojaron como resultado que no existen diferencias significativas por zona (Intervalo de p-valores 90% de confianza: [0.17, 0.87]).

|  |  |
| --- | --- |
| Figura 28. Diferencia en ácido linoleico por zona | Figura 29. Distribución de p-valores para el test de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas en el ácido linoleico por zona |

Y posteriormente, analizando el comportamiento desagregado, se identifican ciertos clones que presentan un comportamiento diferencial por zona, estos son: SCC 80, SCC 23 y FEAR 5.

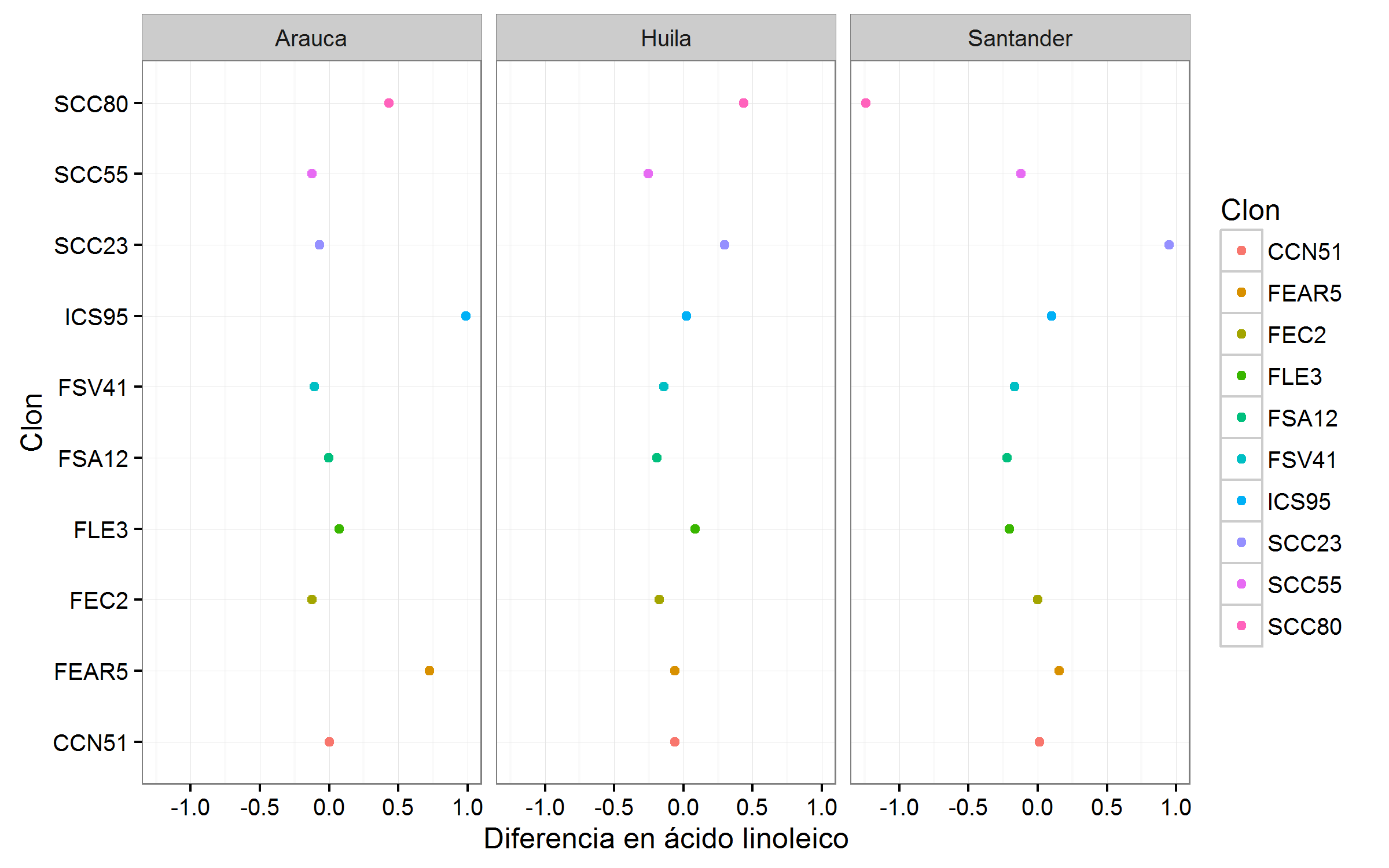


Figura 30. Diferencia en ácido linoleico por zona y clon

Falta catequina y epicatequina

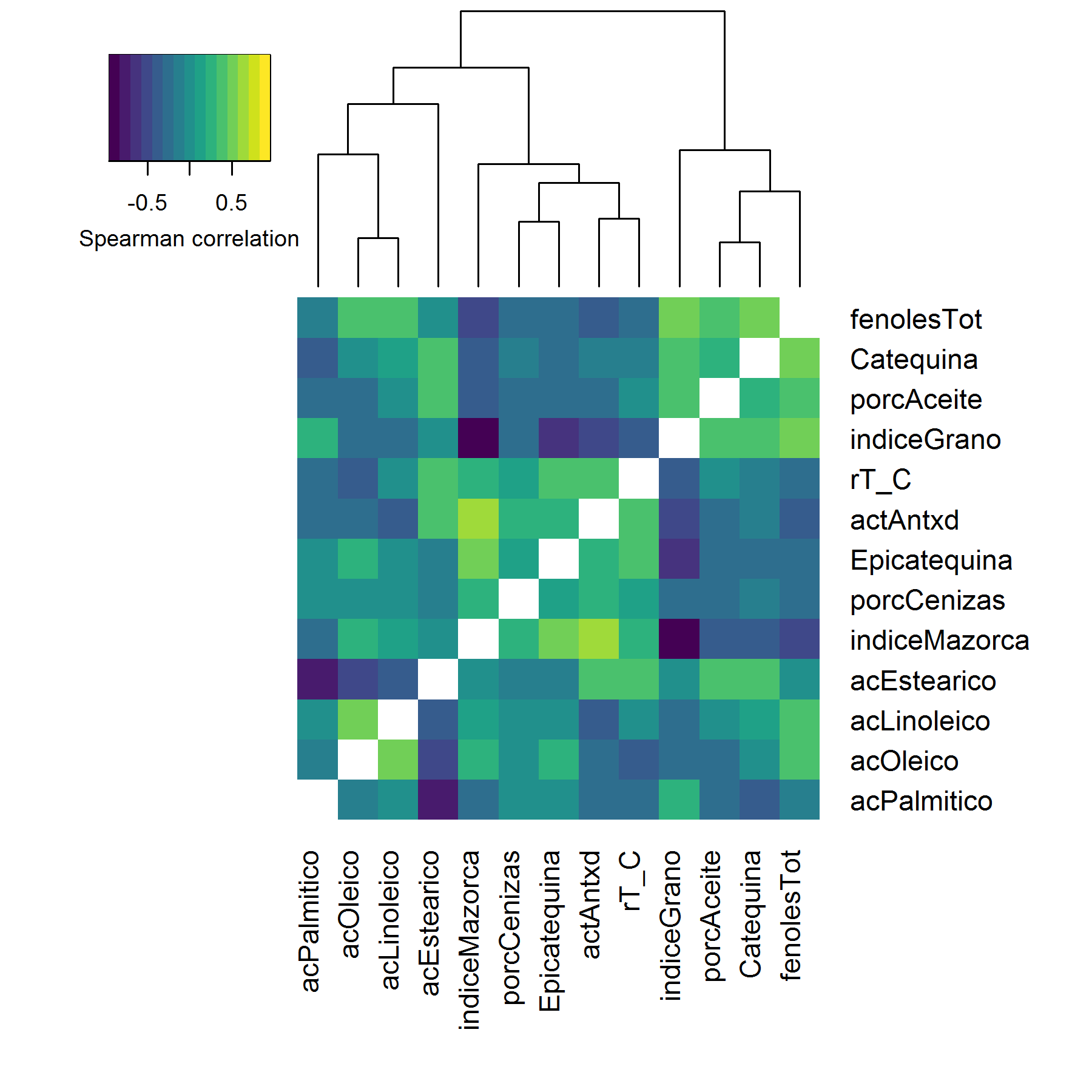
Como conclusiones generales de este objetivo se podría decir que la única variable que ejerce un efecto diferenciador claro en la composición del cotiledón entre zonas y clones es el contenido de aceite, mientras fenoles totales y el contenido de ácidos grasos no muestran alterarse significativamente posterior al proceso de fermentación de granos. Adicional a esto se incluyeron en el análisis los índices de mazorca y grano como variables de cosecha para determinar

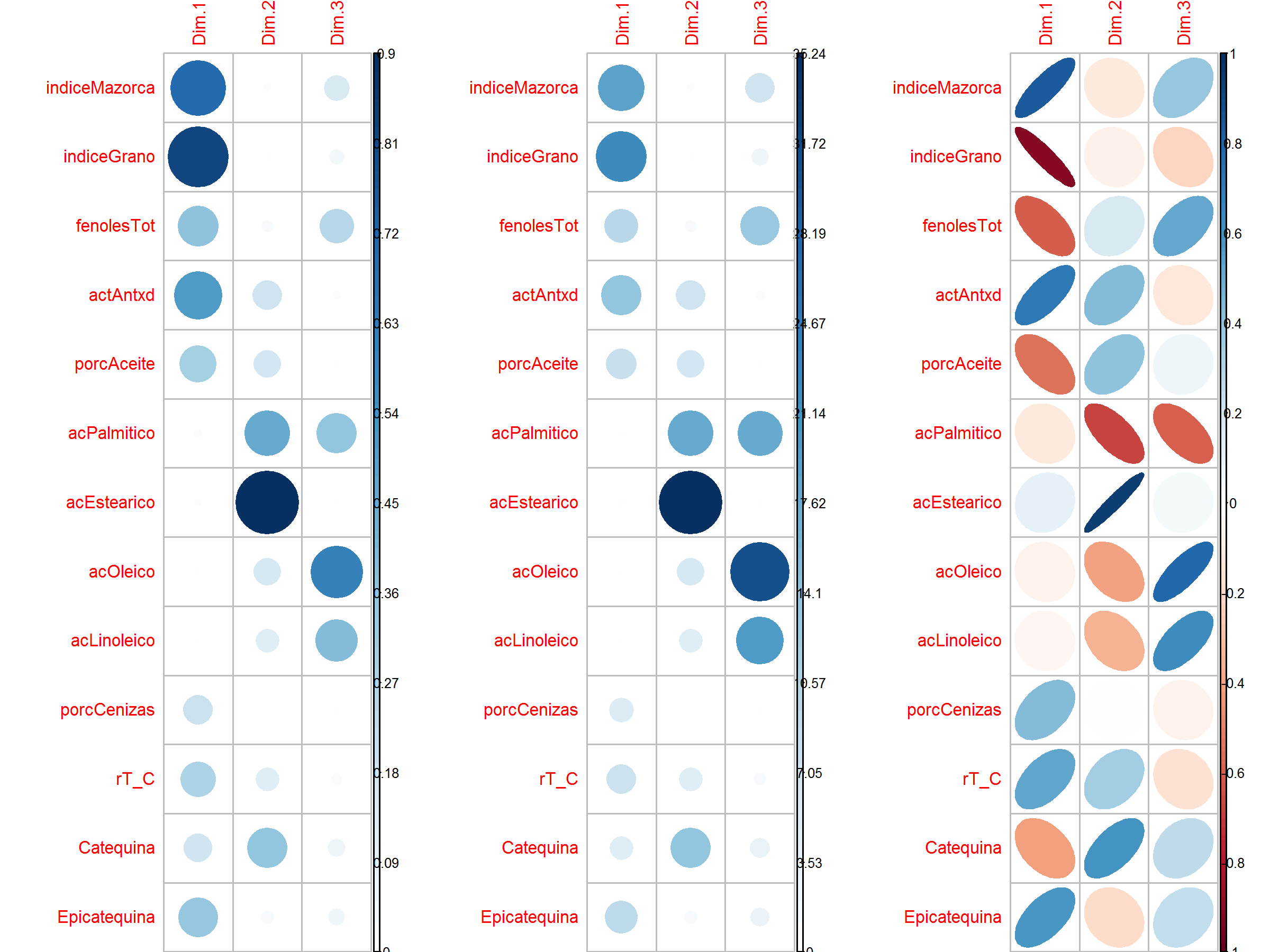
# Objetivo 2

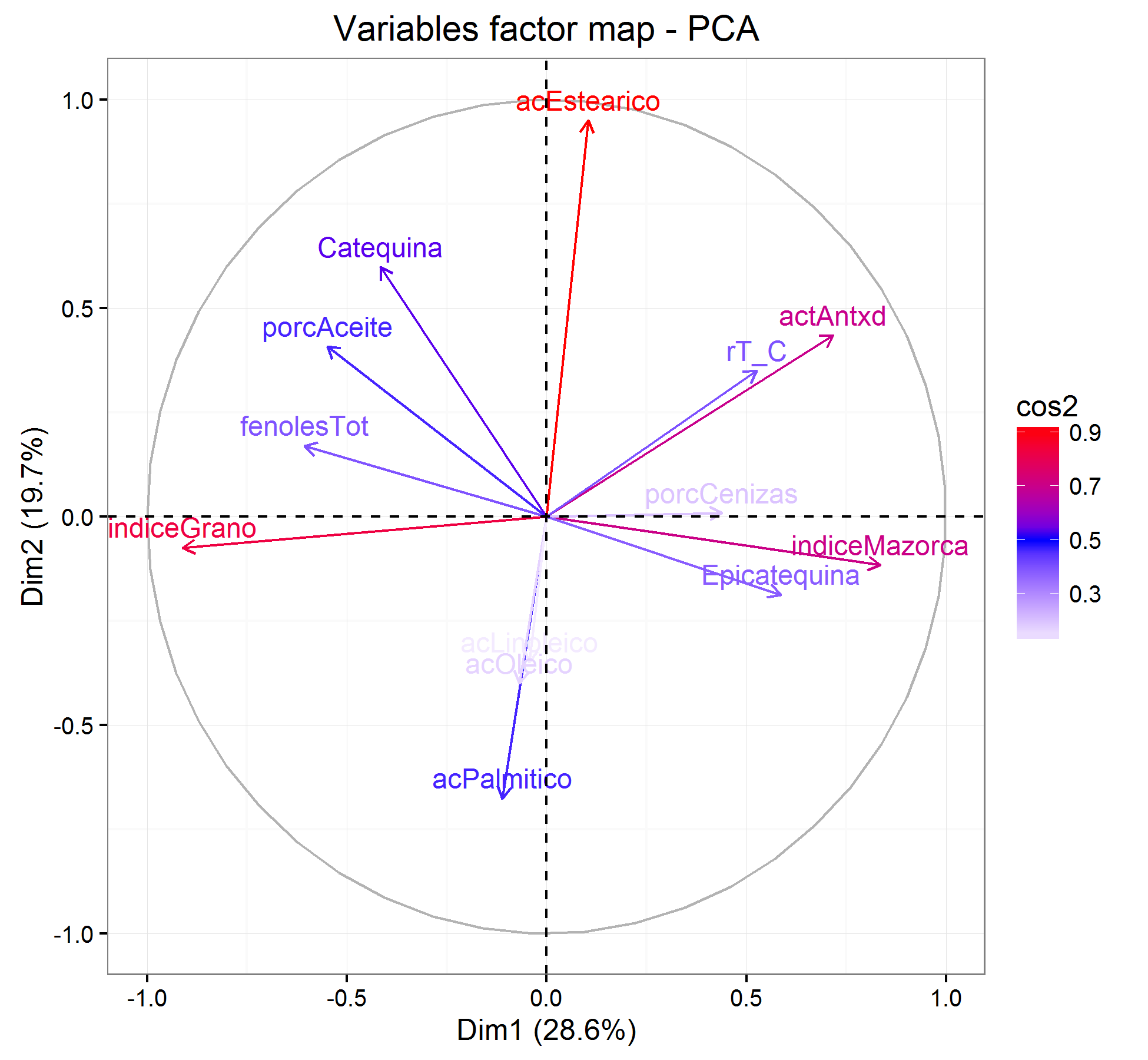
Para identificar los mejores clones según variables fisicoquímicas y funcionales se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando las siguientes variables fisicoquímicas: ácidos grasos (esteárico, oleico, palmítico y relación Tauromina/Cafeína) y como variables funcionales el contenido de fenoles totales, actividad antioxidante, catequinas y epicatequinas.

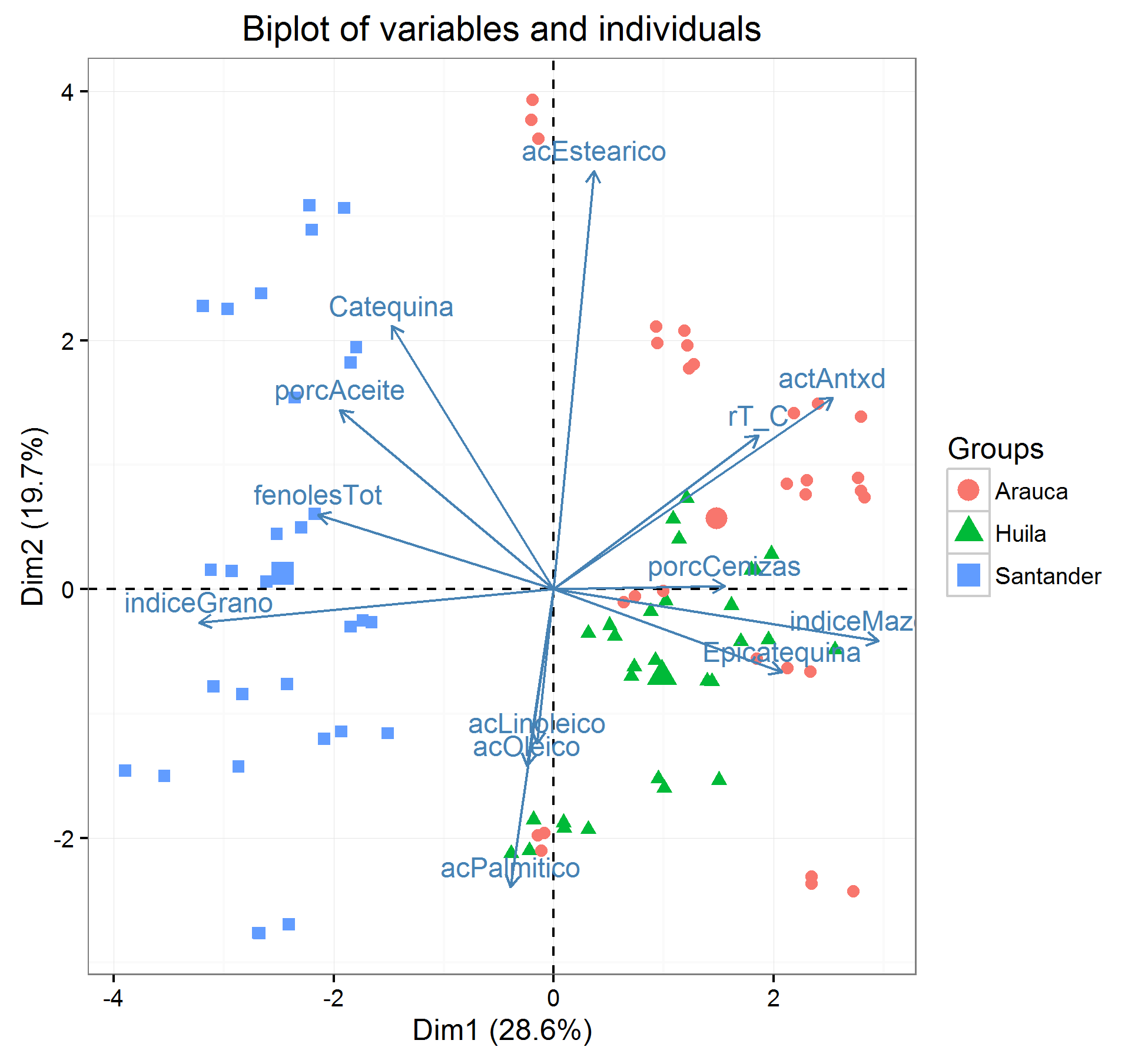
1. Utilizando todas las variables (suelo, índices de mazorca y grano, actividad antioxidante, aceites y variables funcionales). Encontrando que con dos componentes principales se logró alcanzar un porcentaje de variación explicado del 62.6% respecto al total. No obstante, la fuente más fuerte de variación en los datos se ve altamente influenciada por las variables de suelo que tienen tres datos repetidos dependiendo del sitio donde se haya tomado la información. Razón por la cual se descartan los resultados de este análisis.
2. Omitiendo las variables de suelo. Se logra explicar un porcentaje de variación respecto al total de 63.6% usando las tres primeras componentes principales. Dando como resultado que los índices de cosecha y las variables funcionales se relacionan fuertemente con la primera componente principal, mientras los ácidos grasos se relacionan principalmente con la segunda componente. A partir de este punto se podría hacer una discriminación en cuanto a los clones con las mejores características.

Matriz de correlaciones









1. Omitiendo las variables de suelo e índices de cosecha. Se logra explicar un 52.6% de la variación total de los datos. Pero no se muestran patrones claros de respuesta en términos de las dos primeras componentes principales.

# Objetivo 3

Determinación de los principales compuestos que caracterizan los olores y sabores del cacao.

# Objetivo 4

Exploración de la relación genotipo-ambiente.

1. Tener en cuenta que no están los datos por repeticiones sino el promedio de las mismas. [↑](#footnote-ref-1)