



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Unidad Integradora Curricular
previo a la obtención del título
Ingeniero en Alimentos.

Título de la Unidad Integradora Curricular

“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES
PRESENTES EN MUCILAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDAD CCN-51
Y NACIONAL”.

Autor:

Byron Patricio Reyes Ullon.

Tutores de la Unidad Integradora Curricular

Ing. Wilma Maribel Llerena Silva M.Sc (UTEQ)

Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua (INIAP)

Mocache – Los Ríos – Ecuador

2020



DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHO

Yo, **Byron Patricio Reyes Ullón**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; es decir, que no ha sido previamente presentada en ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa vigente.

Byron Patricio Reyes Ullón

C.I. 120531121-8



CERTIFICACIÓN CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Yo Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, M.Sc. Docente de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, y el Dr. Iván Samaniego Maigua, MSc., Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Certifico: que el estudiante, Sr. Byron Patricio Reyes Ullon, realizó la Unidad de Integradora Curricular titulada: **“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN MUCILAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDAD CCN-51 Y NACIONAL”**, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Wilma Llerena Silva, M.Sc.
Auspiciante Académico (UTEQ)

Dr. Iván Samaniego Maigua M.Sc.
Auspiciante Académico (INIAP)



CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Dado cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, los suscritos **Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, M.Sc.**, y el Dr. Iván Samaniego Maigua, M.Sc., Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de Auspiciantes Académicos de la Integración Curricular damos constancia que se ha revisado la Unidad de Integración Curricular titulada **“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN MUCILAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDAD CCN-51 Y NACIONAL”**, de autoría del Sr. Estudiante de la Carrera de Ingeniería en Alimentos **Byron Patricio Reyes Ullon**, certificamos que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 4% el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Document Information

Analyzed document	Tesis_Byron Reyes_14-SEP-2020 final.docx (D86470256)
Submitted	11/24/2020 3:09:00 PM
Submitted by	
Submitter email	byron.reyes2015@uteq.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	wllerenas.uteq@analysis.urkund.com

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.
Auspiciante Académico (UTEQ).

Dr. Iván Samaniego Maigua, MSc.
Auspiciante Académico (INIAP).



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS

UNIDAD INTEGRADORA CURRICULAR

Título:

**“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES
TOTALES PRESENTES EN MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma
cacao* L.) VARIEDAD CCN-51 Y NACIONAL”.**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título
Ingeniero en Alimentos.

Aprobado por:

Ing. Christian Vallejo Torres, M.Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Vicente Guerrón Troya, M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. María Pacheco Tigselema, PhD.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Mocache- Los Ríos- Ecuador

2020

AGRADECIMIENTO

Al concluir esta maravillosa etapa de vida; como me es de costumbre agradezco a mi Dios todo poderoso el cual me da salud, fuerzas y energías para seguir adelante y poder cumplir todos mi objetivo, mis amados padres Patricio Reyes Guerrero y Grace Ullon Arreaga millón gracias por su apoyo incondicional mi amor por usted es infinito, vivo muy orgulloso de ustedes, son unos guerreros que con amor y firmeza me educaron para ser una persona respetuosa y exitosa; mis agradecimiento también para mi amada novia Karla Tapia quien a su vez es mi amiga, compañera, la responsable de proponer proyectos y trabajar para ejecutarlos.

Prestigiosa Universiada Técnica Estatal de Quevedo, gracias por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.

Laboratorios de Servicios de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Santa Catalina y a la Asociación cacaotera “La Cruz “gracias por su colaboración y ser participe importante de este proyecto.

A la mentora de este trabajo Ing. Wilma Llerena, mil gracias por su arduo trabajo, su paciencia, dedicación y las malas noche que tuvo que pasar, éxitos. Al codirector Dr. Samaniego Maigua, infinitos agradecimientos fue un gusto conocerlo y que haya formado parte de este proyecto.

Gracias a los docentes por compartir sus conocimientos y experiencias; a mis amigos Melissa, Arianna, Solsito, Zhunio y Chinchin, compartimos grandiosos momentos y de apoco nos fuimos convertimos en una familia con apellidos distintos los aprecio mucho y espero seguir compartiendo con ustedes.

Byron Reyes Ullon

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico con mucho amor a mi padre, Patricio Reyes y mi amada madre Grace Ullon quienes siempre me brindaron buenos consejos, ayuda moral y económica que fueron muy útil para llevar a cabo mis estudios universitarios.

A mis hermanos, tíos y más familiares que siempre están pendiente de lo que me sucede y estoy haciendo este trabajo también es porte de ustedes. “mi Steffa lo hemos logramos” los amo a todos gracia por el aprecio.

Byron Reyes Ullon.

RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo que se produce principalmente en las regiones tropicales de América Latina. Durante su proceso postcosecha se aprovecha aproximadamente el 20% del fruto fresco y el 80% restante corresponde a productos de desecho: cáscara (65%), placenta (10%) y mucílago (5%).

El mucílago también es conocido como baba de cacao y se encuentra presente en las semillas, como un recubrimiento natural del grano y durante la fermentación se estima que por cada tonelada de cacao seco se desperdicia 70 litros de mucílago.

Con la finalidad de valorizar los residuos de la cadena de beneficio del cacao trabajó con muestras de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional. En las que se determinó el contenido de vitamina C empleando cromatografía líquida HPLC y el contenido de polifenoles y flavonoides totales mediante espectrofotometría UV-VIS.

A nivel estadístico se determinó que las muestras de mucílago de cacao Nacional obtuvieron un mayor contenido de polifenoles ($105,08 \text{ mg AGE} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) y flavonoides ($36,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) totales que las muestras de mucilago de la variedad CCN-51. A pesar que se identificó la presencia de diferentes tipos de ácidos orgánicos, el mucilago de cacao carece de ácido ascórbico (vitamina C).

A partir del análisis de correlación de Pearson se determinó que el contenido de polifenoles y flavonoides totales presento una correlación positiva fuerte ($R^2 \geq 0,99$) entre el contenido fenólico con la capacidad antioxidante medida por ABTS y FRAP. En el método de ORAC, existe una correlación positiva fuerte con el contenido de polifenoles ($r \geq 0,95$) y positiva moderada ($r = 0,50$ a $0,95$) en flavonoides totales.

Los fitonutrientes del mucilago exudado de cacao tienen el potencial de atrapar radicales libres (RL) responsables del daño de proteínas, ADN, ARN; principales precursores de enfermedades degenerativas (ECNT).

Palabras claves: exudado de cacao, cromatografía, actividad antioxidante, valorización de residuos, coproductos.

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a crop that is produced mainly in the tropical regions of Latin America. During its post-harvest process, approximately 20% of the fresh fruit is used and the remaining 80% corresponds to waste products: shell (65%), placenta (10%) and mucilage (5%).

Mucilage is also known as cocoa slime and is present in the seeds as a natural coating of the bean and during fermentation it is estimated that for every ton of dry cocoa 70 liters of mucilage is wasted.

With the purpose of valorizing the residues of the cocoa benefit chain, we worked with samples of cocoa mucilage from the CCN-51 and Nacional varieties. In which it was determined the content of vitamin C using HPLC liquid chromatography and the content of polyphenols and total flavonoids by means of UV-VIS spectrophotometry.

At statistical level, it was determined that Nacional cocoa mucilage samples obtained a higher content of total polyphenols (105.08 mg AGE-100 mL⁻¹) and flavonoids (36.8 mg-100 mL⁻¹) than CCN-51 variety mucilage samples. Although the presence of different types of organic acids was identified, cocoa mucilage lacks ascorbic acid (vitamin C).

From Pearson's correlation analysis, it was determined that the content of total polyphenols and flavonoids presented a strong positive correlation ($R^2 \geq 0.99$) between the phenolic content with the antioxidant capacity measured by ABTS and FRAP. In the ORAC method, there is a strong positive correlation with the content of polyphenols ($r \geq 0.95$) and a moderate positive ($r = 0.50$ to 0.95) in total flavonoids.

The phytonutrients in exudate cocoa mucilage have the potential to trap free radicals (FDRs) responsible for damage to proteins, DNA, RNA; major precursors of degenerative diseases (NCDs).

Keywords: cocoa exudate, chromatography, antioxidant activity, residue recovery, co-products.

TABLA DE CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I.....CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
1.1. Problema de la investigación.	18
1.1.1. Planteamiento del problema.	18
1.1.1.1. Diagnóstico.	18
1.1.1.2. Pronóstico.	18
1.1.2. Formulación del problema.....	18
1.1.3. Sistematización del problema.	19
1.2. Objetivos.....	19
1.2.1 Objetivo general	19
1.2.2 Objetivos Específicos	19
1.3. Justificación.	20
2. CAPITULO II FUNDAMENTACIÓN TEORÍA DE LA INVESTIGACIÓN	21
2.1. Marco Conceptual.....	22
2.2. Marco teórico.....	24
2.2.1. Cacao	24
2.2.2 Cacao cultivos y variedades.	24
2.2.3. Cacao Nacional.....	25
2.2.4. Cacao CCN-51.....	25
2.2.5. Producción mundial del cacao.....	26
2.2.6. Producción de cacao en el Ecuador.	27
2.2.7. Importancia económica del cacao en el Ecuador.....	28
2.2.8. Industrialización y Comercialización del cacao.	28
2.2.9. Manejo de postcosecha.....	29
2.2.9.1. Cosecha del fruto.	29
2.2.9.2. Fermentación del grano.	30
2.2.9.3. Secado del grano.....	30
2.2.10. Residuos generados por postcosecha de cacao.....	30
2.2.10.1. Mazorca.	30
2.2.10.2. Placenta.....	30
2.2.10.3. Mucílago.	31
2.2.11. Valorización de los residuos.....	31

2.2.12. Polifenoles.	32
2.2.13. Microencapsulado.....	32
3. CAPÍTULO III FUNDAMENTO DE LA INVESTIGACIÓN	33
3.1. Localización.....	34
3.2. Tipo de investigación.....	35
3.2.1. Investigación descriptiva.	35
3.2.2. Investigación exploratoria.	35
3.2.3. Investigación experimental.....	35
3.3. Métodos de la investigación.	35
3.3.1. Método inductivo-deductivo.	35
3.3.2. Métodos experimentales.....	35
3.4. Fuentes de recopilación de información.	36
3.5. Diseño de la investigación.	36
3.6. Procedimiento experimental.	38
3.6.1. Muestreo.	38
3.6.2. Manejo postcosecha.....	38
3.6.3. Preparación de las muestras.....	39
3.7.1. Extracción de compuestos fenólicos.	39
3.7.3.Determinación de antioxidantes totales.	40
3.7.4. Validación de los métodos.....	40
3.7.5. Linealidad.	40
3.7.6. Límites de detección y cuantificación.	40
3.7.7. Precisión.	40
3.7.8.Cuantificación.	42
3.7.9. Polifenoles totales.....	42
3.7.10. Flavonoides totales.	42
3.7.11. Vitamina C.....	42
3.8. Recursos humanos y materiales.....	43
3.8.1. Recursos humanos.	43
3.8.2. Materiales.	43
3.8.3. Materiales de laboratorio.....	43
3.8.4. Reactivos.	44
3.8.5. Equipos.....	45
4. CAPITULO IV	47

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1. Resultados Esperados.	48
4.1.1. Validación del método.....	48
4.1.2. Linealidad	48
4.1.3. Límite de detección y cuantificación.....	50
4.1.4. Precisión	51
4.1.6. Flavonoides totales	54
4.1.7. Contenido de vitamina C	55
5.CAPITULO V.....	59
5.1 Conclusiones	61
5.2. Recomendaciones	61
6. BIBLIOGRAFIA VI.....	62
6.1.Bibliografía.....	63
7. ANEXOS VII.....	69
7.1. Anexo1. Análisis FODA.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Estructura de la mazorca de cacao	16
Figura. 2 Planta de Cacao.....	24
Figura. 3 Fruto de cacao Nacional.....	25
Figura. 4 Fruto de Cacao CCN-51.....	26
Figura. 5 Países con alta producción de cacao a nivel mundial.	27
Figura. 6 Principales provincias de Ecuador productoras de cacao	28
Figura. 7 Ubicación geográfica de la investigación.	34
Figura. 8 Trompeta de Horwitz	41
Figura. 9 Curvas de calibración promedio para la determinación de polifenoles y flavonoides totales por concentración de Ácido Gálico	50
Figura. 10 Resultados del estudio de precisión de los métodos para la determinación de capacidad antioxidante de polifenoles (A) y flavonoides totales (B) en muestra de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 en función de los ciclos de extracción.	52
Figura. 11 Contenido de polifenoles totales en mucílago de dos variedades de cacao (Theobroma cacao L.), expresado en mg AGE•100 mL ⁻¹	53
Figura. 12 Contenido de flavonoides totales en mucílago de dos variedades de cacao (Theobroma cacao L.), expresado en mg AGE•100 mL ⁻¹	54
Figura. 13 Cromatograma de análisis de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos en mucílago de cacao CCN-51, por cromatografía HPLC	55
Figura . 14 Cromatograma de análisis de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos en mucílago de cacao CCN-51, por cromatografía HPLC	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del mucílago de cacao.....	31
Tabla 2. Localización de la investigación.....	34
Tabla 3. Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el contenido de polifenoles y flavonoides totales y vitamina C en mucílago de cacao.	37
Tabla 4. Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (Nacional y CCN-51) en el contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales en el mucílago de cacao.....	37
Tabla 5. Matriz de correlación para relacionar el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) y vitamina C de mucílago de cacao con la actividad antioxidante.	38
Tabla 6. Índice de rendimiento del cacao variedad CCN-51 y Nacional	48
Tabla 7. Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración en polifenoles y flavonoides totales	49
Tabla 8. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del contenido de polifenoles (PT) y flavonoides totales (FT) por espectrometría UV-VIS	51
Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) de mucílago de cacao con la actividad antioxidante por ABTS, FRAP Y ORAC.	57

CÓDIGO DUBLIN

Título:	“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN MUCÍLAGO DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) VARIEDAD CCN-51 Y NACIONAL”.
Autor:	Reyes Ullon Byron Patricio
Palabras clave:	Exudado de cacao, cromatografía, actividad antioxidante, valorización de residuos, coproductos.
Editorial:	QUEVEDO: UTEQ, 2020.
Resumen:	El cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) es un cultivo que se produce principalmente en las regiones tropicales de América Latina. Durante su proceso postcosecha se aprovecha aproximadamente el 20% del fruto fresco y el 80% restante corresponde a productos de desecho: cáscara (65%), placenta (10%) y mucílago (5%). El mucílago también es conocido como baba de cacao y se encuentra presente en las semillas, como un recubrimiento natural del grano y durante la fermentación se estima que por cada tonelada de cacao seco se desperdicia 70 litros de mucílago. Con la finalidad de valorizar los residuos de la cadena de beneficio del cacao trabajó con muestras de mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional. En las que se determinó el contenido de vitamina C empleando cromatografía líquida HPLC y el contenido de polifenoles y flavonoides totales mediante espectrofotometría UV-VIS. A nivel estadístico se determinó que las muestras de mucílago de cacao Nacional obtuvieron un mayor contenido de polifenoles (105,08 mg AGE•100 mL⁻¹) y flavonoides (36,8 mg•100 mL⁻¹) totales que las muestras de mucílago de la variedad CCN-51. A pesar que se identificó la presencia de diferentes tipos de ácidos orgánicos, el mucílago de cacao carece de ácido ascórbico (vitamina C). A partir del análisis de correlación de Pearson se determinó que el contenido de polifenoles y flavonoides totales se determinó que existe una correlación positiva fuerte ($R^2 \geq 0,99$) entre el contenido fenólico con la capacidad antioxidante medida por ABTS y FRAP. En el método de ORAC, existe una correlación positiva fuerte con el contenido de polifenoles ($r \geq 0,95$) y positiva moderada ($r = 0,50$ a $0,95$) en flavonoides totales. Los fitonutrientes del mucílago exudado de cacao tienen el potencial de atrapar radicales libres (RL) responsables del daño de proteínas, ADN, ARN; principales precursores de enfermedades degenerativas (ECNT). Abstract: Cocoa (<i>Theobroma cacao</i> L.) is a crop that is produced mainly in the tropical regions of Latin America. During its post-harvest process, approximately 20% of the fresh fruit is used and the remaining 80% corresponds to waste products: shell (65%), placenta (10%) and mucilage (5%). Mucilage is also known as cocoa slime and is present in the seeds as a natural coating of the bean and during fermentation it is estimated that for every ton of dry cocoa 70 liters of mucilage is wasted. With the purpose of valorizing the residues of the cocoa benefit chain, we worked with samples of cocoa mucilage from the CCN-51 and Nacional varieties. In which it was determined the content of vitamin C using HPLC liquid chromatography and the content of polyphenols and total flavonoids by means of UV-VIS spectrophotometry. At statistical level, it was determined that National cocoa mucilage samples obtained a higher content of total polyphenols (105.08 mg AGE-100 mL⁻¹) and flavonoids (36.8 mg-100 mL⁻¹) than CCN-51 variety mucilage samples. Although the presence of different types of organic acids was identified, cocoa mucilage lacks ascorbic acid (vitamin C). From Pearson's correlation analysis, it was determined that the content of total polyphenols and flavonoids presented a strong positive correlation ($R^2 \geq 0.99$) between the phenolic content with the antioxidant capacity measured by ABTS and FRAP. In the ORAC method, there is a strong positive correlation with the content of polyphenols ($r \geq 0.95$) and a moderate positive ($r = 0.50$ to 0.95) in total flavonoids. The phytonutrients in exudate cocoa mucilage have the potential to trap free radicals (FDRs) responsible for damage to proteins, DNA, RNA; major precursors of degenerative diseases (ECNT).
Descripción:	70 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URL:	

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo que se produce principalmente en las regiones tropicales de América Latina. El 90% de la producción a nivel mundial corresponde a pequeños agricultores que poseen extensiones de sembríos inferiores a cinco hectáreas. En Sudamérica, Ecuador y Brasil son los mayores productores de este fruto; mientras que, en el continente africano los países que poseen mayor cantidad de tierra destinada a la producción de cacao son Costa de Marfil y Ghana (1).

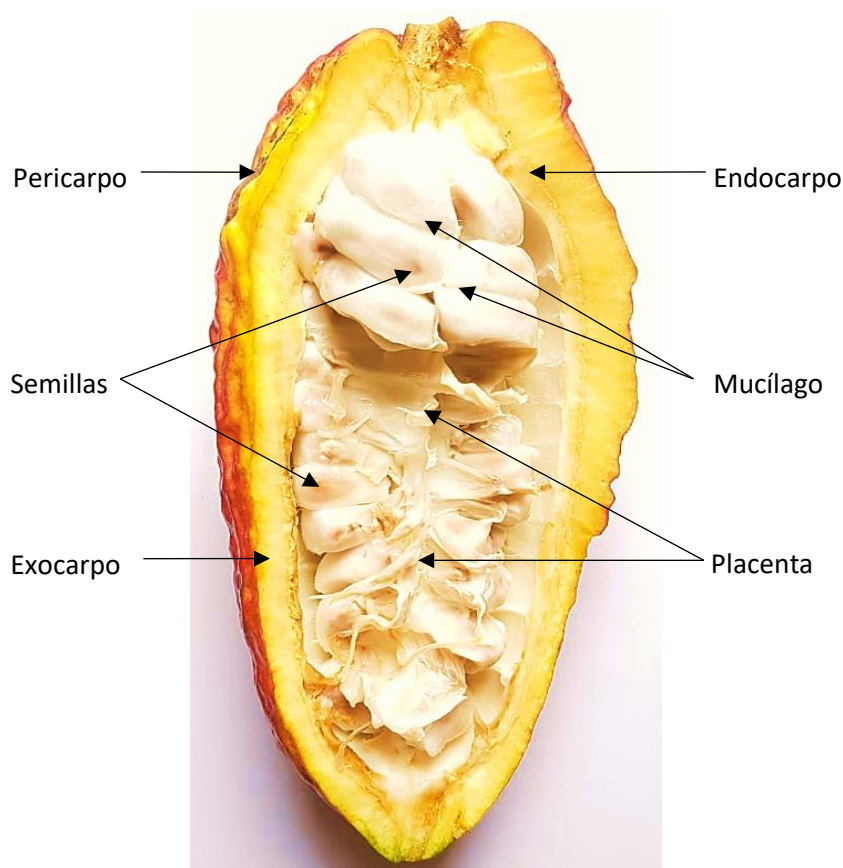


Figura N. 1 Estructura de la mazorca de cacao

Fuente: Reyes ,2020.

El mucílago también es conocido como baba de cacao y se encuentra presente en las semillas, como un recubrimiento natural del grano (Figura 1). Se estima que por cada tonelada de cacao seco se desperdicia 70 litros de mucílago, el cual contribuye en la producción de alcohol y ácido acético durante la fermentación de las almendras (2)

Según el estudio realizado por Chaflan (2016), en el proceso de postcosecha del cacao solo se aprovecha un 20% del fruto fresco; el 80% del peso restante corresponde a productos de desechos, como la cáscara (65%), placenta (10%) y mucílago (5%) (3).

En Ecuador existe limitada información de la composición química de los residuos del cacao, por lo que, no se le da uso industrial. En el caso del mucílago, el interés en las investigaciones en este lixiviado ha despertado interés, puesto que podría convertirse en una posible fuente de polifenoles y otros compuestos bioactivos.

Según investigaciones realizadas por diferentes autores (Pérez – Vizcaíno al. 2002; Quiñones, Miguel, y Aleixandre al. 2012). Los polifenoles, tienen efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Los polifenoles y estos flavonoides, se encuentran presentes de forma natural en alimentos como el cacao; es por ello, que muchos científicos centran su atención en el estudio de estas almendras y su poder antioxidante (4).

Compuestos fenólicos como la catequina y epicatequina convierten al cacao en un candidato potencial para su uso en el desarrollo de alimentos funcionales, con efectos benéficos en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares asociadas al estrés oxidativo (5).

Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015 alrededor de 17,7 millones de personas murieron por enfermedades cardiovasculares, cifra que ha ido en aumento en los últimos cuatro años (6). Por lo que, a partir de esta investigación, se pretende generar fuentes alternativas de compuestos fotoprotectores, provenientes de los recursos infrautilizados de la cadena agroalimentaria del cacao, como el mucílago. Actualmente se conoce que este lixiviado contiene azúcar (10 a 15%), pectina (1%) y ácido cítrico (1.5%) (7); sin embargo, existen escasos estudios que demuestren que el mucílago es una fuente potencial de vitamina C, polifenoles y flavonoides (8).

En caso de evidenciarse un alto contenido de compuestos antioxidantes en el mucílago, se estaría ofertando una alternativa industrial de valorización de residuos. Su aprovechamiento, permitiría solucionar una grave problemática ambiental que enfrentan actualmente los agricultores. Puesto que, el aprovechamiento de residuos del sector cacaotero, disminuiría la cantidad de lixiviados descargados en el campo, y con ello, los efectos negativos.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

Según ANECACAO, entre los años 2017 y 2018, Ecuador exportó 315,571 toneladas métricas de cacao seco; sin embargo, durante la transformación de la mazorca de cacao en chocolate, existe una serie de etapas que generan residuos. En la fermentación, se produce un exudado conocido tradicionalmente como baba de cacao, y su desperdicio es un aproximado de hasta el 5% por tonelada de cacao seco (9).

A medida que crece la producción, el gran volumen de desecho que se genera se convierte en un problema ambiental. Esto provoca la aparición de olores fétidos cuyos lixiviados se filtran directamente en la tierra. En consecuencia se genera un ambiente óptimo para la propagación del hongo *Phytophthora* spp, el cual ataca a diferentes partes de la planta de cacao (hojas, raíces y fruto), causando marchitez e incluso la muerte (10).

Actualmente, en Ecuador existen escasos estudios sobre la valorización de residuos provenientes de las industrias agroalimentarias, lo que dificulta el aprovechamiento integral de los desechos, disminuyendo los ingresos económicos de los agricultores.

Sin embargo, el uso de este desecho agroindustrial, podría representar una fuente potencial de polifenoles, flavonoides y vitamina C, consideradas como sustancias protectoras frente a reacciones responsables de daño oxidativo.

1.1.1.1. Diagnóstico.

La falta de capacitación a productores y organizaciones cacaoteras sobre el proceso de postcosecha, conlleva a un manejo inapropiado de los residuos generados durante la cosecha del cacao.

1.1.1.2. Pronóstico.

La producción de cacao cada vez es mayor y empleado, un manejo postcosecha adecuado y el tratamiento integral de los residuos que se generan, podemos generar componentes bioactivos; y evitar la contaminación medio ambiental.

1.1.2. Formulación del problema.

¿La cuantificación, extracción y conservación de polifenoles y flavonoides de mucílago de las variedades de cacao CCN-51 y Nacional contribuyen al aprovechamiento y valorización de residuos de las industrias agroalimentarias?

1.1.3. Sistematización del problema.

1.1.4.

¿El mucílago de cacao contiene y vitamina c, polifenoles y flavonoide?

¿Se puede valorizar los residuos de la industria cacaotera?

¿El uso industrial de los residuos disminuye el impacto ambiental?

¿El aprovechamiento de los residuos mejora el ingreso económico a los productores?

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Determinar el contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales, presente en el mucílago de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51 y Nacional.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la variedad de cacao en el contenido de antioxidantes de mucílago de cacao.
- Correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de antioxidantes presente en el mucílago de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51 y Nacional.
- Evaluar el contenido de vitamina C en el mucílago de las dos variedades de cacao CCN-51 y Nacional.

1.3. Justificación.

Durante el proceso postcosecha del cacao, se identifican malas prácticas de manejo de residuos que provocan un impacto ambiental negativo, como contaminación de suelo y agua por residuos tóxicos. En base a estadísticas de exportación de ANECACAO, en el año 2018 se estima que hubo en desaprovechamiento de 220,999 litros de mucílago (9).

Además, de los residuos líquidos la cadena de beneficio produce desechos sólidos que para su eliminación son incinerados por parte de los agricultores, afectando la calidad del aire. Sin embargo, hoy en día no solo es necesario tener un margen de utilidad para el productor de cacao, si no que este debe mejorar los rendimientos de sus procesos productivos, de manera que sea más sostenible; con afectaciones mínimas al medio ambiente (11).

Por desconocimiento de la gente, con estos residuos se desperdician nutrientes como glucosa ($214 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), proteína ($7,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido ascórbico ($18,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), potasio ($950 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), calcio ($171,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido cítrico ($9,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido málico ($3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido acético ($2,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y trazas de ácido fumárico, oxálico y láctico. El proceso de valorización de este residuos permitirá extraer estos compuestos, convirtiendo al mucílago del cacao en una fuente importante de fitonutrientes (12).

Los antioxidantes existentes en el mucílago de cacao, pueden aprovecharse de forma industrial. Además, de dar valor agregado a los residuos generados en el proceso de postcosecha del rubro cacaotero, se beneficiará económicamente a los agricultores y se disminuirá también el impacto ambiental.

CAPITULO II

FUNDAMENTACIÓN TEORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual.

Cacao.

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una semilla que está cubierta por una pulpa azucarada de color blanca llamada mucílago. Que después de diferentes procesos donde se elimina el mucílago y una cobertura muy delgada llamada cascarilla queda la almendra. Esta constituye la materia prima principal para la elaboración de chocolate. Antiguamente el cacao era usado como moneda mesoamericana de intercambio comercial (13).

Mucílago.

El mucílago es una sustancia viscosa que cubre la almendra del cacao, generalmente de color blanca, aromática. Es necesaria para la producción de alcohol y ácido acético en el proceso de fermentación de las almendras de cacao (14).

Placenta.

La placenta es la parte interna del cacao, donde se encuentran adheridas las almendras de la mazorca, también conocido como maguey, rica en sustancias pépticas, ácidos y azúcares (15).

Antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias generalmente naturales, capaces de prevenir o retardar el daño celular, su ingesta es recomendable para mantener una buena salud.

Alimentos funcionales.

Los alimentos funcionales son todos aquellos productos que, a más de aportar a la nutrición del ser humano, presentan un efecto potencialmente positivo en la salud.

Polifenoles.

Los polifenoles son compuestos que se originan generalmente en las plantas, lugar donde se sintetizan y ayudan al cumplimiento de sus funciones fisiológicas (16).

Compuestos Bioactivos.

Los compuestos bioactivos son aquellas sustancias que más allá de su aporte nutricional, brindan un efecto benéfico en la salud. Su funcionalidad biológica depende de su actividad farmacológica y el efecto protector (17).

Compuestos fenólicos.

Conformados principalmente por fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes más importantes en la dieta alimentaria, formados por una estructura química adecuada especialmente para ejercer una función antioxidante, pueden encontrarse en estado libre, conjugados con azúcares o ésteres, enlazados a polisacáridos y proteínas o polimerizados, están asociados a características sensoriales principalmente a color, sabor y astringencia (18).

Vitamina C.

Agente antioxidante necesario para la formación y el correcto mantenimiento del material intercelular, según estudios se ha demostrado que puede reducir la acción perjudicial de los radicales libres y ayuda al mejoramiento de la absorción del hierro, se encuentra principalmente en vegetales y frutas frescas. Es sensible a temperatura, luz, y oxígeno degradándose con facilidad si no se realiza un correcto procesamiento de los alimentos (19).

Microencapsulación.

La microencapsulación es el proceso mediante el cual se rodea a una sustancia activa con una pared porosa que la protege, una microcápsula se compone del núcleo y la pared. Este proceso es una herramienta útil para mejorar la liberación de componentes bioactivos, que pueden poseer efectos químicos, físicos y/o biológicos en organismos vivos. Existen varios tipos de microencapsulado entre los cuales tenemos, mononucleares, polinucleares y tipo matriz (20).

2.2. Marco teórico.

2.2.1. Cacao

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un arbusto nativo de Centroamérica y Sudamérica, según estudios de su genética indican que la planta se originó en la cuenca superior del Amazonas y sus cabeceras en Perú, Ecuador, Colombia y Brasil. Es considerado uno de los cultivos perennes bajo sombra más importante del planeta, ya que representa la principal fuente de ingreso de millones de personas (12,21).

En siglo XIX el cultivo del cacao se extendió notablemente a otras regiones, por lo que en la actualidad es producido por más 40 países ubicado en la región tropical de África, Asia y América. Se estima que, en la actualidad a nivel mundial, es cultivado por 5,5 millones de agricultores, principalmente por pequeños productores que poseen superficies menores a cinco hectáreas, que tienen una situación socio-económica vulnerable y presentan limitado acceso a la tecnologías y asesoramiento técnico (22).



Figura N. 2 Planta de Cacao

Fuente: Reyes,2020.

2.2.2. Cacao cultivos y variedades.

Existe una lista extensa sobre las variedades de cacao cultivadas a nivel mundial entre las cultivadas tenemos el cacao criollo, cacao forastero, cacao híbrido acriollado. En Ecuador se producen en mayor volumen dos materiales de cacao, destinadas a la exportación: la variedad Nacional y el híbrido de la Colección Castro Naranjal (CCN-51), este último es un híbrido natural entre criollo y forastero.

Se estima que el 90% de producción de cacao fino se realiza de manera tradicional o semitécnica, mientras que, la mayoría de la variedad CCN-51, se produce en sistemas tecnificados (23).

2.2.3. Cacao Nacional.

El cacao Nacional, originario del alta Amazonía; su mazorca en estado inmaduro son de color verde, paulatinamente pasan a ser de color amarillo cuando están maduras lista para su cosecha, sus almendras son moradas de excelentes características organolépticas (22). También conocido como sabor Arriba es una variedad única en el mundo que se caracteriza por tener una fermentación muy corta; lo que proporciona un chocolate clasificado como “Fino de Aroma”. Los agricultores, comúnmente denominan a los árboles de cacao Nacional, como Forastero (24).

En América Latina el Ecuador se promociona como país competitivo en este campo de producción, seguido de Venezuela, Panamá y México, que son países que poco a poco han ido incrementando su participación en el mercado mundial de cacao fino de aroma en grano (25).



Figura N. 3 Fruto de cacao Nacional

Fuente: Díaz, 2015.

2.2.4. Cacao CCN-51.

El híbrido CCN-51 es una variedad de cacao resistente a enfermedades, altamente productivo, desarrollado por el ecuatoriano Homero Castro en la década de 1996. Actualmente se ha ganado la reputación de producir cacao de calidad y se considera una amenaza para la diversidad de genética, cuya actividad productiva es precoz; iniciando su actividad productiva dos años después de su siembra (26). El árbol de este tipo de cacao es

pequeño y de fácil manejo agronómico, sus frutos tienen una coloración rojiza en su estado de desarrollo y madurez. Sin embargo, a muchas personas dedicadas a la actividad cacaotera le resulta más fácil y rentable cultivar esta variedad de cacao (27).



Figura N. 4 Fruto de Cacao CCN-51

Fuente: Reyes, 2020

2.2.5. Producción mundial del cacao.

El cacao es uno de los rubros más importantes en la economía mundial. El índice de producción de cacao por continentes está representado de la siguiente manera: el continente africano con un 72.5%, liderando la producción mundial, siendo el continente con mayor superficie de terreno destinada a la producción del grano de cacao; seguido por el continente americano con una participación del 18%; y Asia y Oceanía con el 9.5% (28).

Los países más destacados en cuanto a la producción de cacao corresponden a los del continente africano tales como: Costa de Marfil, Gana, Camerún, Indonesia y Nigeria; mientras que en América Latina y el Caribe, sobresalen Brasil, Ecuador, Perú, Colombia y República Dominicana. La producción a nivel mundial señala continuación:

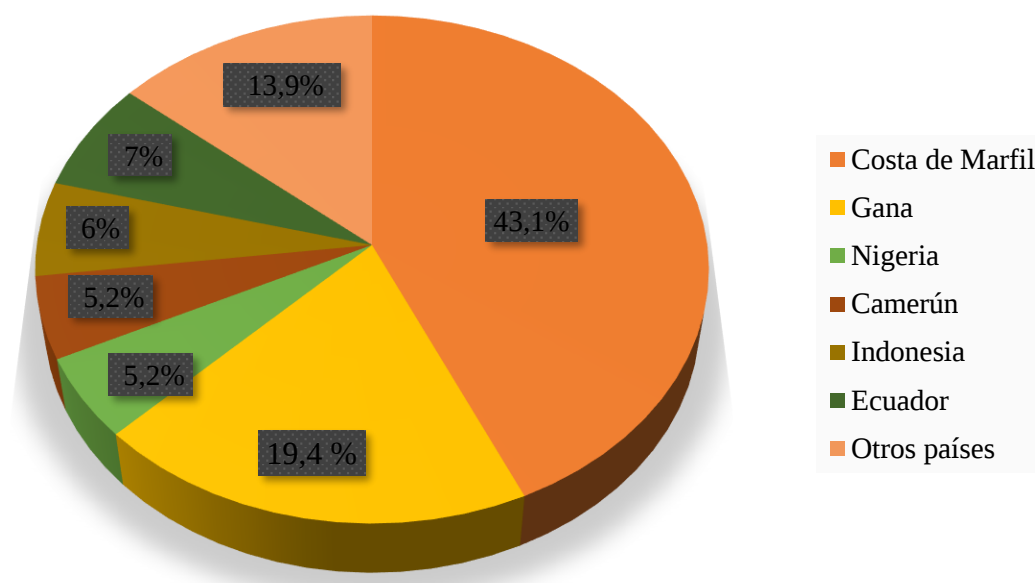


Figura N. 5 Países con alta producción de cacao a nivel mundial.

Fuente: Organización Internacional del Cacao, 2018.

2.2.6. Producción de cacao en el Ecuador.

Según la Corporación Financiera Nacional (CFN), indica que el Ecuador es el cuarto productor de cacao a nivel mundial. Por lo que, representa el cuarto rubro de las exportaciones no petroleras del país (29). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el país es el segundo mayor exportador de cacao de América Latina; obteniendo resultados satisfactorios con el híbrido CCN-51, puesto que éste es resistente a la enfermedad de la escoba bruja, responsable de una gran pérdida en la producción de cacao (30).

La producción del cacao en Ecuador está representada principalmente por pequeños productores, aproximadamente el 70%, seguida por productores medianos con un 20%, y grandes productores que representa aproximadamente el 10%. El cacao es uno de los principales productos tradicionales de exportación ecuatoriana, que para el bien económico de país ha ido creciendo durante los últimos años (28).

De acuerdo a la ficha sectorial proporcionada por la CFN, las provincias de Ecuador que lideran la producción del cacao son: Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas y el Oro.

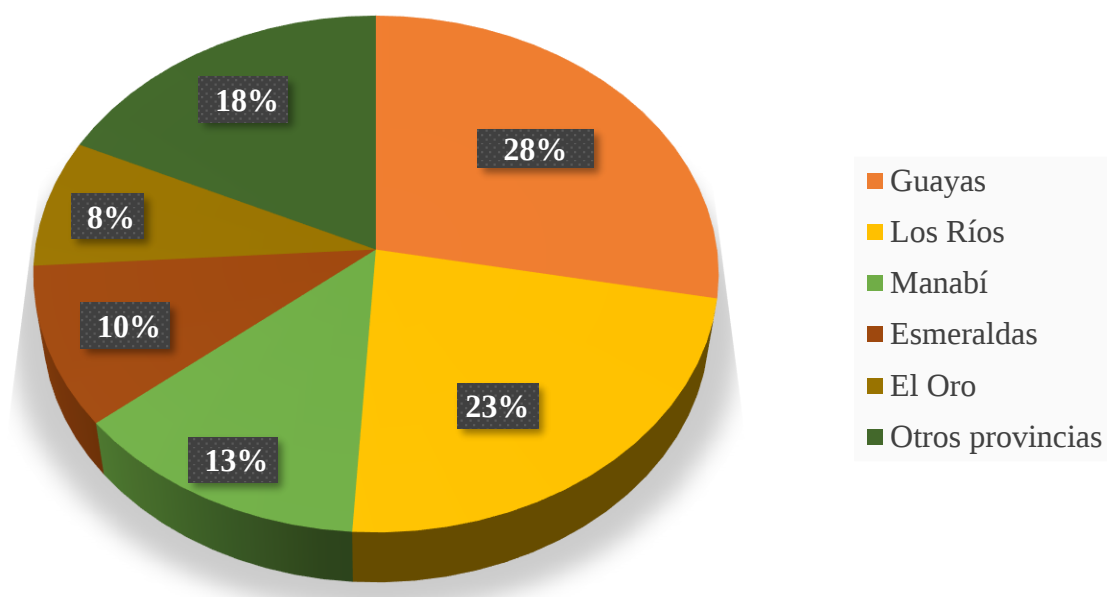


Figura N. 6 Principales provincias de Ecuador productoras de cacao

Fuente: Corporación Financiera Nacional, 2018

2.2.7. Importancia económica del cacao en Ecuador.

La importancia económica del cultivo de cacao se debe a que genera empleo directo para aproximadamente 600,000 personas; a lo largo de toda la cadena cacaotera. Actualmente, existe aproximadamente 490,000 hectáreas de cultivo distribuidas en las provincias de la costa y en las estribaciones de la región Andina (25).

En la última década, el país alcanzó un incremento del 100% en producción y exportación cacaotera. La producción del cacao ecuatoriano se destinadas principalmente a la Unión Europea, (60%), América (30%), Asia (9,5%) y África (0,5%) (25).

Según investigaciones de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), el 30 % de cacao en grano exportado desde Ecuador, pertenece al híbrido CCN-51. El mayor porcentaje de almendras vendidas en mercados internacionales como el de EE.UU., corresponde a un producto de menor calidad. Sin embargo, el 23% de la producción total vendida a Europa y Japón pertenece al cacao de la más alta calidad (sabor Arriba) (23).

2.2.8. Industrialización y comercialización del cacao.

La industria de semielaborados abarca la transformación del cacao en productos intermedios (manteca, pasta, licor, polvo), que son destinados al mercado externo. La producción de semielaborados se destina principalmente a la exportación y es dominada por grandes

empresas, entre las que destacan Nestlé, CAFIESA, INFELERSA, ECUACOCOA y FERRERO (31).

La producción de semielaborados es dominada por empresas grandes (3 de 6 empresas) en tanto que la producción de chocolate y productos de chocolate es dominada por empresas pequeñas (6 de 9 empresas). Y en la elaboración de productos de confitería dominan las empresas medianas y pequeñas (8 de 12 empresas) (31).

Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO) en los últimos 50 años tanto la oferta como la demanda mundial de cacao han seguido una tendencia creciente, con un incremento anual de alrededor del 2.5%. La demanda de cacao mantuvo un comportamiento estable, mientras que, la producción cacaotera evidenció una mayor variabilidad (23).

2.2.9. Manejo de postcosecha.

Según estudios previos de Infocacao (2017), el proceso de postcosecha de cacao es de vital importancia en la determinación de la calidad del producto final y específicamente en el desarrollo de las características sensoriales, se debe aplicar un manejo estricto en las etapas de fermentación y secado ya que de estos depende la característica de color olor y sabor. En la recolección del cacao el machete es una herramienta inapropiada para realizar la cosecha del fruto, ya que, este puede ocasionar cortes indeseables en la mazorca y los cojinetes florales (32).

La postcosecha son un conjunto de técnicas que se realizan entre la cosecha y el procesamiento artesanal o industrial del grano seco. Este proceso comprende una serie de etapas como: cosecha, clasificación, partido, extracción de las almendras, fermentación, secado, limpieza y empaque; concluyendo con el transporte de la almendra seca (33) . Sin embargo, los puntos críticos del manejo para la actividad de postcosecha se dan en el fermentado y secado del grano, puesto que, este sigue siendo un proceso rudimentario. Principalmente por que los productores no cuentan con herramientas y técnicas para medir la temperatura y evaluar las característica externas e internas de la semillas (34).

2.2.9.1. Cosecha del fruto.

La recolección de la fruta de cacao se la lleva a cabo una vez haya alcanzado su madurez fisiológica el cual tiene una prolongación de 5 a 6 meses después de la floración. Se recomienda cosechar todas las mazorcas maduras, sobre maduras y dañadas por plagas y enfermedades. La mejor manera de reducir el daño de mazorca por sobre maduración, es

realizar su cosecha cada quince días o menos, para esta actividad se recomienda utilizar tijeras de podar y pica o media luna para los frutos que están en las ramas altas. Por ningún motivo debe cosecharse la fruta arrancando el pedúnculo o retorciendo la mazorca (32).

2.2.9.2. Fermentación del grano.

La fermentación es una etapa muy importante debido a que se producen reacciones bioquímicas las cuales ocasionan una disminución del amargor y la astringencia que dan origen a los precursores del aroma y sabor a chocolate, los cuales son características sensoriales muy importantes dentro de la industria chocolatera, sin embargo existen varios aspectos que influyen en el proceso de fermentación entre ellos el tipo de cacao, tiempo del almacenamiento del fruto, tipo de fermentación, tiempo del proceso, remoción etc. (35).

2.2.9.3. Secado del grano.

El secado de los granos de cacao es un proceso de vital importancia debido a que en esta etapa se reduce el exceso de humedad que queda después del proceso de fermentación, lo cual evita la proliferación y desarrollo de mohos que deterioran la calidad del grano, otro aspecto a destacar es que en este proceso continúa con la fase oxidativa iniciada en el proceso de fermentación y se completa la formación de los compuestos del aroma y sabor, en esta etapa es donde ocurre el desarrollo de los pigmentos a partir de los compuestos fenólicos.

Considerar que una humedad dentro de estándares nos facilita un buen almacenamiento, manejo y comercialización de grano de cacao (35).

2.2.10. Residuos generados por postcosecha de cacao

2.2.10.1. Mazorca.

La mazorca, también denominada cáscara o vaina es la parte externa del cacao en su interior se encuentran las semillas protegidas de condiciones climáticas adversas y plagas, mide 15-30 cm de largo y 10 cm de ancho con una masa de unos 500g, su color y tamaño es diferente de acuerdo a la variedad y las condiciones del cultivo. En la madurez, la mayoría de las veces tiene un color rojizo o parduzco. El pericarpio es relativamente carnoso, de 10 a 15 mm de espesor, se vuelve más duro y resistente en la maduración (8).

2.2.10.2. Placenta.

La placenta o también denominada maguey, es la parte central de la mazorca en la cual se encuentran adheridos mucílagos y los granos de cacao ;unas de las principales funciones de

la placenta es nutritiva a los granos, se estima que representa al rededor del 4 % del peso total de la mazorca (15).

2.2.10.3. Mucílago.

El mucílago es una sustancia que aparece como recubrimiento del grano de cacao, es viscosa, aromática y particularmente de color blanco, la cual se desprende durante el proceso de fermentación, esta pulpa mucilagínosa está compuesta por células de sabia rica en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales (8-10%) (36).

El mucílago de cacao contiene materiales insolubles en suspensión que le confieren alta viscosidad, por lo cual debe ser procesado de inmediato, o en caso de ser almacenado debe ser sometido a un tratamiento preservante o a una congelación de al menos -2° a -4° C (37).

Tabla 1. Componentes del mucílago de cacao.

COMPONENTES	g/100 g FM%
Agua	79.20-84.20
Proteína	0.09-0.11
Azúcares	12.50-15.9
Glucosa	11.6-15.32
Pectina	0.9-1.19
Ácido cítrico	0.77-1.52
Cenizas	0.44-0.50

FM: materia fresca

FUENTE: Tapia (2016) (37).

2.2.11. Valorización de los residuos.

En los últimos años, el incremento del consumo de chocolate y la demanda internacional de cacao ha despertado una preocupación social y ambiental, enfocando su interés en diferentes actores de su cadena de beneficio. Sin embargo, en Ecuador el avance tecnológico en este cultivo no ha sufrido cambios positivos, por lo que, gran parte de los componentes del fruto no son utilizados.

Debido a la escasez de recursos naturales y a los graves problemas ambientales, diversos investigadores han intentado convertir tales subproductos en ingredientes para su aplicación en otras industrias (38). Según el Centro de Comercio Internacional, últimamente se ha incrementado el interés mundial por el uso de cascarilla de cacao, llegando a exportarse este residuo desde países como Costa de Marfil y Sierra Leona hacia España y Málaga, (39). Los componentes de estos desechos son exportados como aditivos alimentarios o suplementos de alto valor nutritivo; al considerarse un producto de alto valor su recuperación puede ser económicamente atractiva (38).

2.2.12. Polifenoles.

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante, presentes en frutas, vegetales y granos secos, que se caracterizan por la presencia de un anillo aromático en su estructura (40). Estos son considerados como sustancias que retardan el envejecimiento celular y el daño oxidativo. A pesar de que inicialmente los polifenoles fueron empleados por su capacidad para alargar la vida útil de los alimentos, su incorporación en la dieta permite prevenir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, trastornos inflamatorios intestinales y cáncer. La dosis de ingesta recomendada dependerá de su capacidad de respuesta al daño oxidativo, recomendándose dosis bajas puesto que son tóxicos en dosis altas (41,42).

Los productos del cacao como el chocolate son una fuente importante de antioxidantes polifenólicos; catequinas y procianidinas, su consumo contribuye a elevar la carga antioxidante total (43).

2.2.13. Microencapsulado.

El microencapsulado es una técnica ampliamente utilizada en la industria, esta tecnología se define como un proceso en el cual se realiza una envoltura de una sustancia sobre otra, la cual puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso. El propósito de la microencapsulación es atrapar compuestos sensibles como sabores volátiles y lábiles; promueve la fácil manipulación y control del producto (44). Esta tecnología ha de gran interés para las industrias farmacéutica, especialmente en la industria alimentaria, ya que los productos microencapsulados están protegidos de agentes externos como son el oxígeno la humedad, aumentando significativamente la vida útil del producto y , conservando sus propiedades físico químicas (45)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

Para la ejecución de este trabajo de investigación se realizó el análisis fisicoquímico y funcional del mucílago en colaboración con diferentes instituciones, cuya localización se detalla a continuación:

Tabla 2. Localización de la investigación.

INVESTIGACIÓN	LOCALIZACIÓN
Preparación de la muestra	Asociación “La Cruz”, ubicada en el Cantón
Recolección, fermentación	Mocache, provincia de los Ríos.
Análisis fisicoquímico y antioxidantes	Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en el cantón, Mejía – Quito, provincia de Pichincha.

Elaborado por: Reyes, 2020.

A continuación se presenta el mapa de localización donde se realizó la adquisición de muestras y los análisis experimentales.



Figura N. 7 Ubicación geográfica de la investigación.

3.2. Tipo de investigación.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se aplicó investigación cuantitativa documental. A partir del trabajo de revisión bibliográfica se estructuró el desarrollo del trabajo experimental; permitiendo analizar el fenómeno de manera directa. Como se detalla a continuación:

3.2.1. Investigación descriptiva.

A través de la investigación descriptiva se determinó las relaciones y aspectos de los fenómenos en estudio, lo que permitió identificar el problema de investigación y las variables en estudio.

3.2.2. Investigación exploratoria.

El trabajo de investigación exploratoria se desarrolló con la finalidad de integrar la información teórica con los resultados experimentales. Para esto se recopiló información que permitió reconocer, ubicar y definir el problema. Además de fundamentar las hipótesis y establecer la metodología para la ejecución de la investigación.

3.2.3. Investigación experimental.

La relación entre las variables de estudio se determinó a través de un modelo o diseño experimental para determinar desde el punto de vista probabilístico los fenómenos de relación.

3.3. Métodos de la investigación.

3.3.1. Método inductivo-deductivo

En el presente trabajo de investigación se aplicó el método inductivo-deductivo, puesto que para la obtención de los resultados se partió de un problema que tiene como finalidad de hallar posibles soluciones al desperdicio y mal manejo que se le da al mucílago de cacao. A través del aprovechamiento de este residuo para aplicaciones alimentarias.

3.3.2. Métodos experimentales.

Se establecieron las variables de estudiar y métodos de análisis para la tabulación de los datos obtenidos de polifenoles, flavonoides y vitamina C en el mucilago de cacao, se empleó

un software. Así también, se estableció la relación del contenido de antioxidantes totales del exudado, con la capacidad antioxidante de cacao.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

3.4.1. Fuentes primarias.

Las fuentes primarias de la información que se emplearon en el desarrollo de este trabajo fueron el trabajo de campo y las pruebas de laboratorio, partiendo de la recolección del mucílago de cacao (CCN-51 y Nacional), hasta la realización pre-ensayos y cuantificación del contenido de polifenoles y flavonoides totales en el mucílago de cacao

3.4.2. Fuentes secundarias.

Las fuentes secundarias de recopilación de la información se emplearon para la obtención de material bibliográfico referencial, a través de diferentes fuentes bibliográficas como: libros, artículos científicos, revistas científicas, tesis doctorales, trabajos de fin de master y tesis de pregrado. Los recursos bibliográficos contribuyeron en el desarrollo metodológico de la investigación, el análisis e interpretación de resultados

3.5. Diseño de la investigación.

La evaluación de los efectos de la variedad de procedencia del cacao (CCN-51 y Nacional), sobre los componentes antioxidantes del mucílago se realizó mediante la prueba “t” de Student. Las hipótesis experimentales planteadas fueron:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$ H_0 : No existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el contenido de polifenoles y flavonoides totales y vitamina C en el mucílago de cacao.
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ H_1 : Existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el contenido de polifenoles y flavonoides totales y vitamina C en el mucílago cacao.
- Tabla 3. Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad.

Tabla 3. *Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el contenido de polifenoles y flavonoides totales y vitamina C en mucílago de cacao.*

Réplicas	Cacao CCN-51	Cacao Nacional
1	Y_{10}	Y_{20}
2	Y_{11}	Y_{21}
3	Y_{12}	Y_{22}

Elaborado por: Reyes 2020

Las determinaciones se realizaron con un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0,05$).

3.5.1. Esquema del análisis de varianza.

En la Tabla 4, se presentan el esquema del ANDEVA para la prueba “t” de Student de dos muestras emparejadas. Mediante el estadístico “t” de Student, se evaluó el efecto de la variedad de cacao en los componentes antioxidantes de las muestras de mucílago.

Tabla 4. *Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (Nacional y CCN-51) en el contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales en el mucílago de cacao.*

Parámetros	Cascarilla	
	Cacao Nacional	Cacao CCN-51
Media	$= \frac{\sum_j X_j n_j}{N}$	$= \frac{\sum_j X_j n_j}{N}$
Varianza	$= \sqrt{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N (x_1 - x_2)^2}$	$= \sqrt{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N (x_1 - x_2)^2}$
Número de observaciones	N = 3	N = 3
Grados de libertad	N-1 = 2	N-1 = 2
Estadísticos t		
P(T<=t) una cola	$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{x_1 x_2} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}}$	$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{x_1 x_2} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}}$
Valor crítico de t (una cola)	9.925	9.925
P(T<=t) dos colas	$= \frac{(X_1 - X_2) - \delta_0}{S}$	$= \frac{(X_1 - X_2) - \delta_0}{S}$
Valor crítico de t (dos colas)	4.30	4.30

Elaborado por: Reyes 2020

3.5.2. Análisis de correlación.

Para determinar los compuestos antioxidantes responsable de la capacidad antioxidante de las muestras de mucílago de cacao se aplicó un análisis de correlación de Pearson (Tabla 5), a través de los cuales se identificó el grado de correlación que existe entre el contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales con la actividad antioxidante in vitro de las muestras estudiadas. Los valores de capacidad antioxidante de las muestras de mucílago de cacao fueron tomadas del trabajo de investigación realizado por Zhunio 2020, quien estudio la “Evaluación de la capacidad antioxidante en mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedades: CCN-51 y Nacional”.

Tabla 5. Matriz de correlación para relacionar el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) y vitamina C de mucílago de cacao con la actividad antioxidante.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	CONTENIDO FENOLICO TOTAL Y VITAMINA C		
	Polifenoles	Flavonoides	Vitamina C
ABTS	r_{xx}	r_{xy}	r_{xz}
FRAP	r_{yx}	r_{yy}	r_{yz}
ORAC	r_{zx}	r_{zy}	r_{zz}

Elaborado por: Reyes ,2020

3.6. Procedimiento experimental.

3.6.1. Muestreo.

El muestreo se realizó escogiendo al azar árboles de cacao Nacional Fino de Aroma y CCN-51 de la colección de la Asociación “La Cruz” ubicado en el cantón Mocache provincia de Los Ríos. A partir de esto se realizó el proceso de beneficiado del cacao, de donde se fueron recolectando los residuos empleados como material de estudio (mucílago de cacao). Las unidades experimentales estuvieron constituidas por 45 kg de cacao en baba de cada variedad.

3.6.2. Manejo postcosecha.

El proceso postcosecha de las muestras recolectadas de cacao se realizó en el Centro de fermentación y secado de la Asociación “La Cruz”, ubicada en el cantón Mocache provincia de Los Ríos. De cada fruto se extrajeron los granos con la ayuda de un machete y se extrajeron los granos recubiertos de mucílago, formando una masa de 45 kg por cada variedad, luego fueron fermentadas en cajas de madera de laurel (dimensiones 100 cm de

alto x 100 cm de ancho x 95 cm de profundidad), con una capacidad de 150 kg de masa, ubicadas en forma de escalera de tres pisos.

En cacao Nacional la fermentación se realizó durante 4 días (96 horas) manteniéndose 2 días en el cajón superior, 1 día en el cajón intermedio y 1 día en el cajón inferior; mientras que, para cacao CCN-51 la fermentación se realizó durante 6 días (144 horas) durante 2 días en cada cajón. Para asegurar un proceso adecuado de fermentación se realizó la remoción del grano cada 24 horas y un volteo de la masa cada 48 horas.

Durante el proceso de destilación se recolectó 4 L de mucílago de cada variedad y estas fueron almacenadas en congelación (-18°C), para su posterior estudio.

3.6.3. Preparación de las muestras.

Para la ejecución de las determinaciones analíticas, las muestras de las dos variedades de mucílago de cacao fueron almacenadas en congelación (-18°C) en recipientes herméticos aislados de la luz, humedad y oxígeno; para su conservación y posterior caracterización funcional.

3.7. Contenido de antioxidantes totales.

3.7.1. Extracción de compuestos fenólicos.

En muestras de mucílago de cacao, se realizó diferentes pruebas a partir de las cuales se determinó que las medidas analíticas deben realizarse en muestra fresca. Para esto el mucílago se sometió a un proceso de centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos con ayuda de una centrifuga SIGMA (modelo 4-16Ks, Alemania). El sobrenadante obtenido fue empleado para la determinación de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales en mucílago de cacao.

3.7.2. Extracción de Vitamina C.

Para la extracción de vitamina C de las muestras de mucílago de cacao, se pesaron 0,3 mL de muestra y se añadió 10 mL de una solución etanólica 95% (etanol/agua;95/5; %v/v). Las muestras fueron colocadas en un baño de ultrasonido (Scientific/Ultrasonic batch 5,7 L) con control de temperatura durante 20 minutos y se agitó el balón cada 5 minutos. Posteriormente, se dejó acondicionar la muestra a temperatura ambiente y se aforó a 25 mL con la solución extractante. Después de aforar la muestra se filtró con ayuda de una jeringa de 0,45 µm y se colocó en viales de HPLC, ámbar (44).

3.7.3. Determinación de antioxidantes totales.

3.7.4. Validación de los métodos.

Para la determinación de polifenoles y flavonoides totales se realizó la validación de los métodos experimentales en base a los siguientes parámetros[43].

3.7.5. Linealidad.

A través de la linealidad se determinó la capacidad de los métodos empleados para dar una respuesta proporcional a la concentración del analito. Para esto se elaboraron curvas de calibración empleando estándares de con ácido gálico para (polifenoles) y catequina para (flavonoides) durante 3 días, en intervalos de concentración de 0 a 100ppm para cada determinación analítica. A partir de los valores de concentración definidos (X) y el promedio (n=3) de lectura de absorbancia (Y) se obtuvieron las curvas de calibración.

La validación de las curvas se realizó en base a un estudio de regresión lineal, en el cual se determinó parámetros como la pendiente (m), el coeficiente de determinación (R^2) y el intercepto (a). Para las concentraciones medidas ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) se estableció como criterio de aceptación cualitativo un $R^2 \geq 0,99$ (46).

3.7.6. Límites de detección y cuantificación.

Para la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizaron seis mediciones de blanco o testigo que estuvo compuesto por todos los reactivos (agua, Folin&Ciocalteu, carbonato de sodio 20%) menos la muestra; siguiendo las recomendaciones establecidas en las guías técnicas de validación de métodos (Sandoval, 2010). A partir de estas mediciones se calculó el LD a través de la absorbancia promedio del blanco más tres DS ($\text{blanco} + 3\text{DS}$). En caso del límite de cuantificación se expresó como la absorbancia promedio del blanco más seis DS ($\text{blanco} + 6\text{DS}$). El LD y el LC indican la cantidad mínima que se puede detectar y cuantificar mediante estos métodos con exactitud y precisión.

3.7.7. Precisión.

La precisión del método se evaluó a través de un ensayo de repetibilidad, para esto se analizó una muestra de cada variedad con cinco repeticiones, bajo las mismas condiciones de ensayo (analista, laboratorio y equipo) siguiendo la metodología establecida para el estudio, en un mismo día. A partir de las mediciones se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (Sandoval, 2010). Con los resultados se verificó que el método tenga

la precisión adecuada para el nivel de concentración medida ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) utilizando la ecuación de Horwitz ($\text{CV}_{\text{Horwitz}}$). Este parámetro es utilizado para la validación de ensayos interlaboratorios, y relaciona el CV en función de la concentración del analito, como se muestra en la (Figura 8) también conocida como trompeta de Horwitz (47).

La evaluación de la precisión del método se determinó a través de un ensayo de repetibilidad, para esto se analizó una muestra de cada variedad con cuatro réplicas, bajo las mismas condiciones de ensayo (analista, laboratorio y equipo). A partir de las mediciones se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (47). Con los resultados se verificó que el método tenga la precisión adecuada para el nivel de concentración medida ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) utilizando la ecuación de Horwitz ($\text{CV}_{\text{Horwitz}}$). Este parámetro es utilizado para la validación de ensayos interlaboratorios y relaciona el CV en función de la concentración del analito, como se muestra en la Figura 14, conocida como trompeta de Horwitz. Para la concentración evaluadas ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) se acepta $\text{CV}_{\text{Horwitz}} \leq 5-8\%$ por considerarse micronutrientes (47).

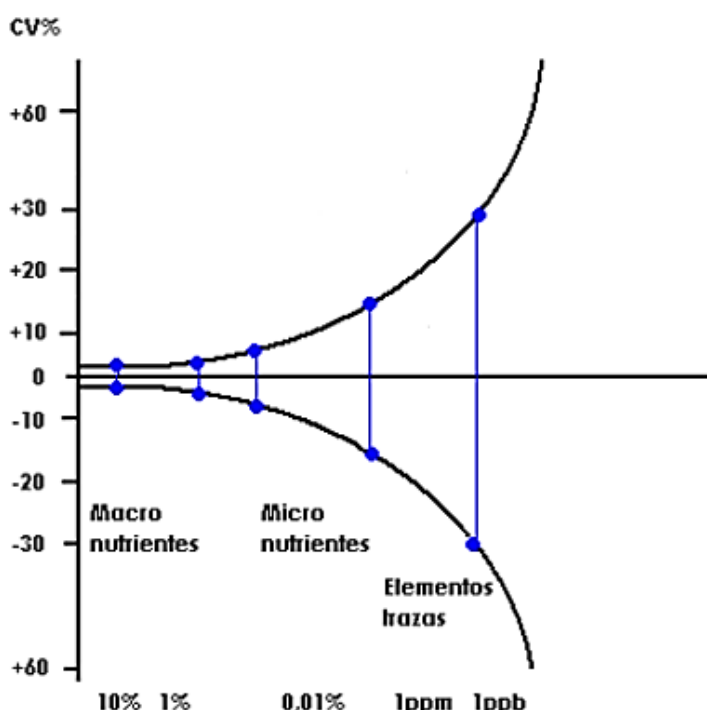


Figura N.8 Trompeta de Horwitz

Fuente: Sandoval (2010).

3.7.8. Cuantificación.

3.7.9. Polifenoles totales.

El contenido de polifenoles totales (PT) se determinó mediante el método descrito por Samaniego et al (48). Para el análisis, se tomó 1 mL de muestra centrifugada de mucílago y se produjo la reacción colorimétrica añadiendo agua, reactivo de Folin – Ciocalteu's y Na_2CO_3 (20%; p/v). Una vez incubada la mezcla (40°C; 2 minutos), se midió la absorción utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-VIS 2600; Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados fueron interpolados en una curva de calibración ($y = 0,0036x + 0,0678$, $R^2 = 0,9994$) con ácido gálico (0 a 100 ppm) medida durante tres días (n=9).

El contenido de PT se expresó en términos de mg de Acido Gálico por cada 1mL de muestra en base húmeda (BH)(48).

3.7.10. Flavonoides totales.

La determinación del contenido de Flavonoides totales (FT) se realizó siguiendo el método descrito por Zhishen, et al 1999. Para esto se tomó 1mL de muestra centrifugada de mucílago de cacao y se hizo reaccionar con nitrato de sodio, cloruro de aluminio e hidróxido de sodio. La absorbancia de la mezcla se midió con ayuda de un espectrofotómetro (Shimadzu UV-VIS 2600; Kyoto, Japón) a 490nm. El contenido de FT se cuantificó utilizando una curva de calibración ($y=0,0036x+0,0678$, $R^2=0,9994$) de catequina medida por triplicado durante 3 días (n=9). Los resultados se expresaron en mg de catequina por cada mL de peso en base húmeda (BH).

3.7.11. Vitamina C.

La determinación de contenido de ácidos orgánicos (vitamina C) de las muestras de mucílago de cacao se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) empleando cromatógrafo líquido Agilent Technologies serie 1100/1200 (Waldbronn, Alemania), con detector UV (254 nm). La separación se realizó utilizando una columna de exclusión iónica Biorad HPX-87H (300 mm x 7,8 mm; tamaño de partícula 9µm).

Para el análisis, se inyectaron 10 µL de muestra en el equipo (autoinyector G1329A) y se fueron eluyendo, a un caudal de 1.0 mL•min⁻¹ utilizando como fase móvil ácido sulfúrico (H₂SO₄; 0.01 N) a una temperatura de 30 °C. La elución de la fase móvil se realizó en isocrático; durante 67 min.

La identificación y cuantificación se realizó por comparación con estándar de ácido ascórbico. (49).

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Recursos humanos.

Para la realización de esta investigación se contó con los siguientes recursos humanos.

- Ing. Wilma Llerena Silva, Directora del proyecto de Investigación.
- Dr. Iván Samaniego Maigua., Cotutor del proyecto de Investigación.
- Ing. Jaime Vera Chang M.Sc., Académico de Apoyo.
- Ing. Christian Vallejo Torres M. Sc., Académico de Apoyo.

3.8.2. Materiales.

3.8.3. Materiales de laboratorio.

- Vasos de precipitación de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
- Tubos de ensayo
- Balones de aforo de 25, 50, 100, 250 y 500 mL
- Probetas de 10, 250, 500 y 1000 mL
- Tubos de centrífuga de 15 y 50 mL
- Espátula
- Agitadores magnéticos
- Puntas para micropipeta 100-1000 μ L y 1-10 mL
- Pissetas
- Gradillas
- Frascos de vidrio color ámbar
- Papel filtro
- pH-metro
- Bureta de 50 mL
- Pinzas para bureta

- Soporte universal
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Puntas de micropipeta 20-200 µl
- Puntas de micropipeta 100-1000 µl
- Puntas de micropipeta de 1-10 mL
- Tubos Eppendorf
- Guantes de nitrilo pack/50
- Mascarillas
- Frascos plásticos de 250 mL, para muestras

3.8.4. Reactivos.

- Ácido fórmico (pureza 99 %)
- Ácido gálico estándar (pureza 98 %)
- Etanol (grado analítico 99,9 %).
- Hexano (ACS, 98 %)
- Metanol gradiente analítico (98 %).
- Acetato de potasio (pureza 99 %)
- Hidróxido de sodio (pureza 99 %)
- Agua destilada
- Fosfato de sodio monobásico
- Fosfato de sodio dibásico
- Acetona (grado analítico 98 %).
- Acetato de sodio (pureza 99 %)
- Ácido fórmico (pureza 99 %)
- Ácido clorhídrico fumante (37 %)

- Ácido gálico estándar (pureza 98 %)
- Catequina estándar (pureza 98 %)
- Agua destilada
- Butilhidroxitolueno (BHT, grado alimentario)
- Cloruro de calcio (ACS)
- Cloruro de aluminio (ACS).
- Cloruro de potasio
- Ácido clorhídrico
- Acetato de sodio
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Ácido gálico
- Nitrito de sodio

3.8.5. Equipos.

- Brixómetro
- Congelador
- Balanza analítica
- Estufa de secado
- Baño ultrasónico
- Baño María
- Centrífuga
- Espectrofotómetro

- Vortex
- Rotoevaporador
- Vortex
- Reflectómetro
- Espectrofotómetro UV-VIS
- pH-metro
- Placa agitadora
- Cronómetro
- Micropipeta Finnpipette 20-200 µl
- Micropipeta Finnpipette 100-1000 µL
- Micropipeta Labnet de 1-10 mL
- Micropipeta Finnpipette de 1-10 mL
- Micropipetas 100-1000 µL y 1-10 mL
- Refractómetro 0 a 30 °Brix

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

Para la determinación del índice de rendimiento se realizó un ensayo utilizando 17 mazorcas de cacao de cada variedad. En la variedad CCN-51 los componentes obtuvieron un peso promedio de 814 g para las mazorcas, 27 g de placenta, 558 g de cáscara, 226g de almendras frescas. Cada mazorca presentó un número de 49 granos aproximadamente.

Tabla 6. Índice de rendimiento del cacao variedad CCN-51 y Nacional.

Cacao.	Mazorca o cascara.	Placenta.	Mucílago.	Almendras de cacao.	Cascarilla de cacao.
					
CCN-51	68,4%	3,2%	5,3%	20,9%	2,2%
NACIONAL	79,9%	0,75%	3,5%	14,45%	1,4%

Elaborado por: Reyes,2020

4.1.1. Validación del método

La validación metodológica del proceso de extracción y cuantificación de los compuestos antioxidantes descritos en los apartados de la metodología presentaron los siguientes resultados.

4.1.2. Linealidad

Dentro de la validación del método se realizó el estudio de linealidad de las curvas patrón de ácido gálico y catequina para los métodos de polifenoles totales y flavonoides totales; respectivamente. Para lo cual, se emplearon las medidas de absorbancias de las curvas elaboradas en tres días diferentes. Los análisis estadísticos de la linealidad se presentan en la (Tabla 7).

Tabla 7. Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración en polifenoles y flavonoides totales.

PARÁMETROS	PROMEDIO	
	Polifenoles	Flavonoides
m (pendiente)	0,0089	0,0036
L _o (ordenada al origen)	0,0229	0,0678
S _{y,x} (error típico)	0,0612	0,0053
S _m (Desv st pendiente)	0,0007	0,0001
S _{L_o} (Desv. St ordenada)	0,0417	0,0039
Coefficiente de determinación (R ²)	0,999	0,999
t (student)	2,7764	2,7764
m(min)	0,0070	0,0034
m(máx)	0,0109	0,0037
L _o (min)	-0,0928	0,0571
L _o (máx)	0,1386	0,0785

Elaborado por: Reyes,2020

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 7, las curvas de calibración patrón de ácido gálico y catequina presentaron un coeficiente de determinación (R²) superior a 0,999. Esto resultados indican que existe una alta correlación entre la concentración de los estándares (X) y la absorbancia (Y) ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$). Por lo tanto, el 99,9% de la variabilidad de los datos experimentales pudo ser explicada por los modelos de regresión obtenidos, mostrando un ajuste lineal optimo en todos los casos (47). En la Figura 9, se presenta la curva de calibración promedio empleada para la cuantificación del contenido antioxidantes totales de las muestras de estudio.

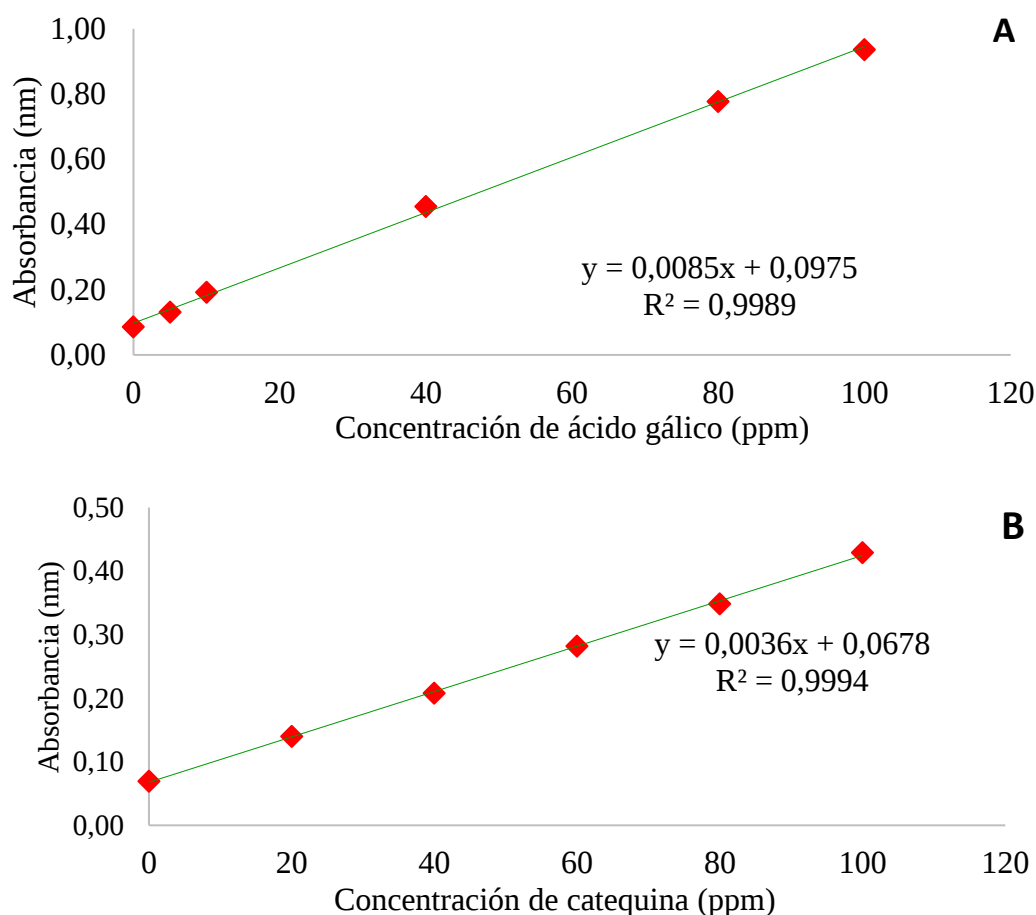


Figura N. 9 Curvas de calibración promedio para la determinación de polifenoles y flavonoides totales por concentración de Ácido Gálico

Las curvas de calibración de polifenoles y flavonoides totales, mostraron un ajuste lineal adecuado ($R^2 \geq 0,99$) en todos los casos. Por lo cual, se estableció que existe una alta correlación entre la señal analítica (absorbancia) y la concentración, comprobándose que el equipo y los analistas proporcionan resultados confiables.

4.1.3. Límite de detección y cuantificación

A partir del cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinó la concentración mínima de analito que puede detectar el equipo utilizado, como se muestra en la Tabla 8. Estos valores dependen de la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco a un nivel de confianza dado.

Tabla 8. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del contenido de polifenoles (PT) y flavonoides totales (FT) por espectrometría UV-VIS

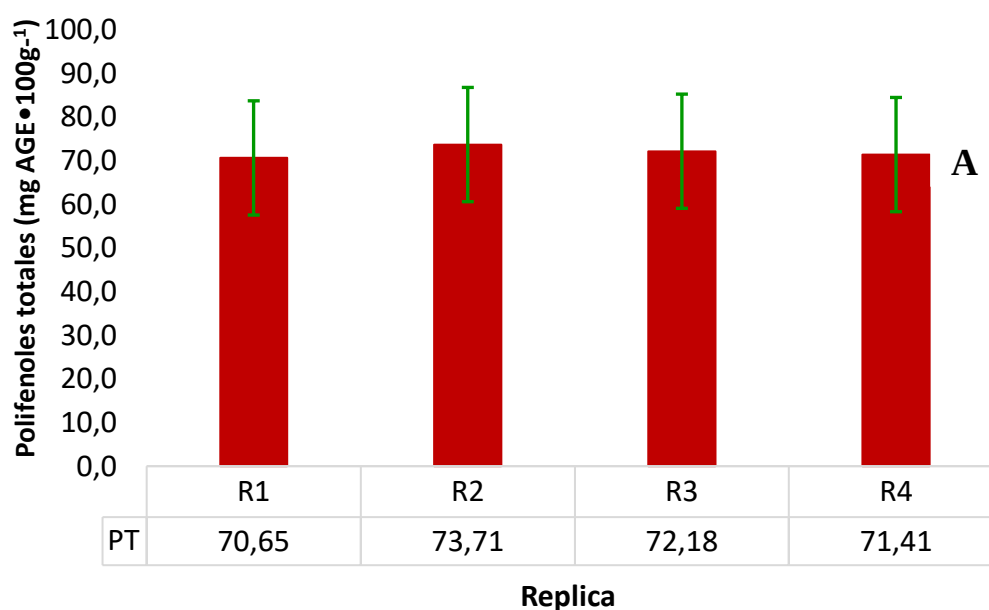
MUESTRAS	PROMEDIO	
	Polifenoles	Flavonoides
LC (concentración mg•L ⁻¹)	9,0709	4,9635
LD (concentración mg•L ⁻¹)	7,3905	2,6720
LC (concentración mg•mL ⁻¹)	0,0091	0,0050
LD (concentración mg• mL ⁻¹)	0,0074	0,0027
LC (concentración mg•100 mL ⁻¹)	0,9071	0,4964
LD (concentración mg•100 mL ⁻¹)	0,7391	0,2672

Elaborado por: (Reyes, 2020)

Según los resultados presentados en la Tabla 8, la concentración mínima de analito que puede detectar (LD) el equipo utilizado para los métodos de polifenoles y flavonoides fueron 0,739 y 0,267 mg•L⁻¹; respectivamente. Mientras que, la cantidad mínima de analito que puede cuantificar el equipo para el contenido de polifenoles y flavonoides totales fueron de 0,907 y 0,496 mg•L⁻¹, en ese orden (47).

4.1.4. Precisión

Una vez validado el proceso de detección y cuantificación del espectrofotómetro utilizado se realizaron los ensayos de precisión de la técnica empleada, en base a la repetitividad. Está se estableció midiendo el contenido de polifenoles y flavonoides en una muestra con cuatro replicas como se detalla en la (Figura 10 A-B).



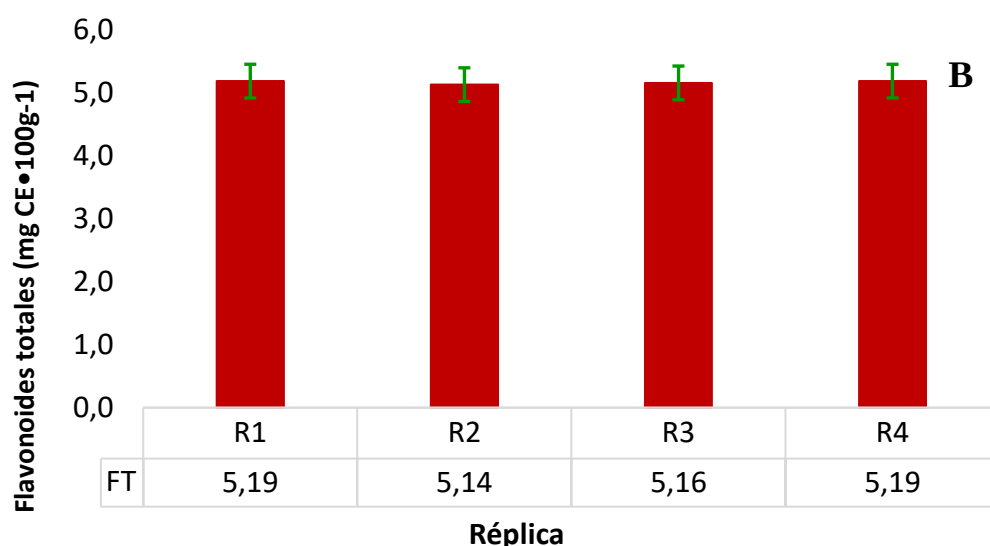


Figura N. 10 Resultados del estudio de precisión de los métodos para la determinación de capacidad antioxidante de polifenoles (A) y flavonoides totales (B) en muestra de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 en función de los ciclos de extracción.

Los resultados del ensayo de repetividad Figura 10-A para la determinación del contenido de polifenoles totales presento un valor promedio de $71,98 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$; mientras que en la Figura 10-B, la concentración promedio de flavonoides totales fue de $5,17 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Los coeficientes de variación (CV) para polifenoles y flavonoides fueron de 1,82% y 0,52%; respectivamente. Los valores de CV de los métodos estudiados estuvieron dentro de los limites (5 a 8%) establecidos por Horwitz (Figura 9), para concentraciones de $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Por lo tanto, los métodos utilizados para la determinación del contenido de antioxidantes totales presentan una precisión adecuada y están aptos para los análisis propuestos.

4.1.5. Polifenoles totales

Una vez que las determinaciones analísticas fueron previamente adaptadas y validadas en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del INIAP, se procedió a la cuantificación del contenido de polifenoles totales, como se muestra en la Figura 11.

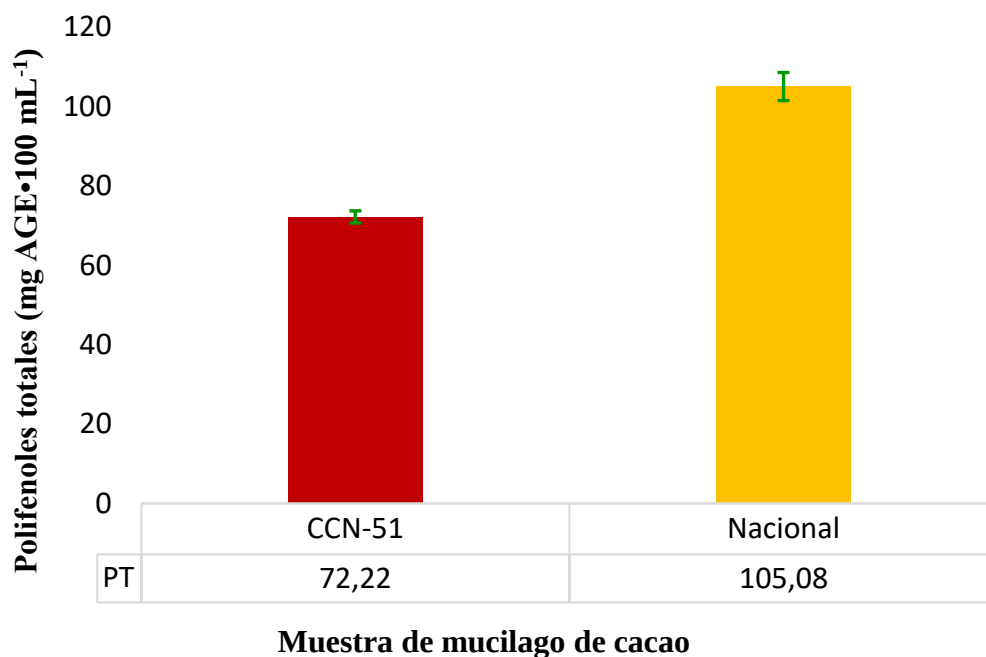


Figura N. 11 Contenido de polifenoles totales en mucílago de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.), expresado en mg AGE•100 mL⁻¹.

En base a los resultados presentados en la Figura 11, se estableció que las muestras de mucílago de cacao de la variedad CCN-51 (72,22 mg AGE•100 mL⁻¹) presentó un menor contenido de polifenoles totales (TPC) que las muestras de la variedad Nacional (105,08 mg AGE•100 mL⁻¹). Los valores obtenidos demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las dos variedades de procedencia del mucílago de cacao; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0). De tal manera, que existe un efecto de la variedad de cacao en el contenido de polifenoles totales del mucílago, con un valor de $p_{\text{calculado}}$ (0,00062) inferior al valor de $p_{\text{crítico}}$ (0,05). Los resultados obtenidos en este estudio, son inferiores a los valores reportados por Martínez (2012), quien reportó un contenido de polifenoles totales de 173,67 a 182,63 mg AGE•100 mL⁻¹ para muestras de mucílago de cacao procedentes de Cono y Taura en la provincia del Guayas, extraídas en una solución metanol agua. Mientras que, el contenido fenólico de las muestras extraídas con una solución etanólica (102,00 a 109,00 mg AGE•100 mL⁻¹) fueron cercanos a los valores reportados en este trabajo para muestras de cacao Nacional (105,08 mg AGE•100 mL⁻¹) (50).

La variación encontrada en este trabajo de investigación y los valores reportados por Martínez, puede atribuirse a los métodos de extracción y la zona de procedencia de las muestras. Según Naczki y Shahidi (2006) (51), la recuperación de los compuestos fenólicos

de los materiales vegetales está influenciada por la solubilidad de los compuestos antioxidantes en el solvente utilizado para el proceso de extracción y la polaridad del disolvente (51).

Para Samaniego et al (2020), la variación de resultados entre los diferentes estudios podría depender de los principales factores intrínsecos y extrínsecos que afectan el contenido fenólico de los granos de cacao, como el genotipo, la temporada de cosecha, el lugar de procedencia y los procesos postcosecha. Es así que, que este comportamiento se ve reflejado en los productos y subproductos del cacao (52).

El valor promedio de ingesta recomendado para prevenir enfermedades es de 23mg de antioxidante por día (53).

4.1.6. Flavonoides totales

Dentro de la evaluación del contenido de antioxidantes totales presentes en el mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional se determinó la concentración de flavonoides totales, como se muestra en la Figura 12.

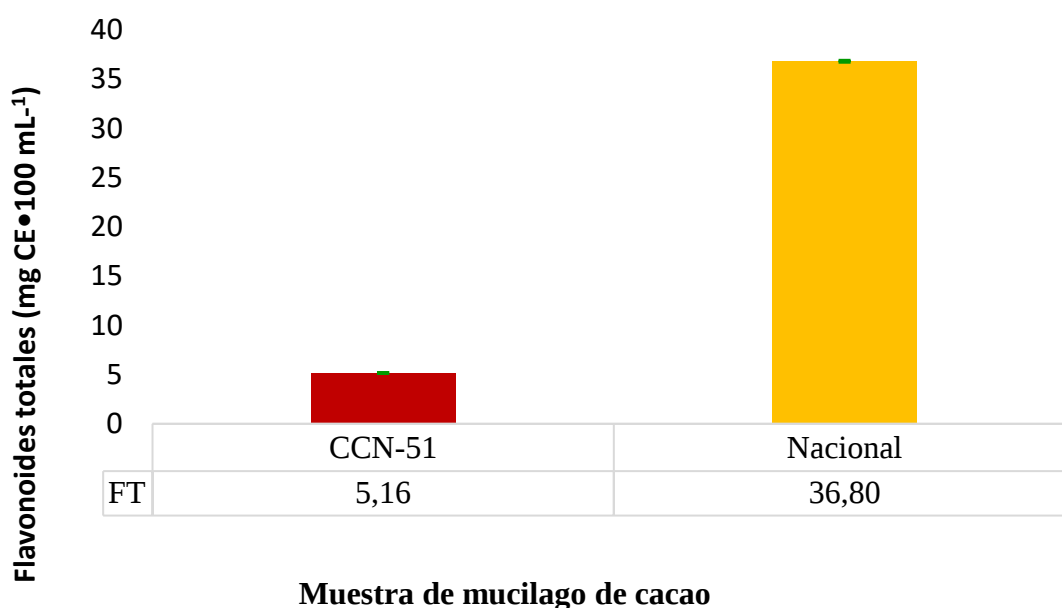


Figura N. 12 Contenido de flavonoides totales en mucílago de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.), expresado en mg AGE•100 mL⁻¹.

De igual manera que, en el contenido de polifenoles totales las muestras de mucílago de cacao de la variedad CCN-51 presentó un menor contenido de flavonoides totales (5,16mg•100 mL⁻¹) que las muestras de la variedad Nacional (36,8 mg•100 mL⁻¹), como se muestra la Figura 12. Existe una limitada información en cuanto a la determinación del

contenido de flavonoides totales en exudado de cacao y según el trabajo de investigación presentado por Gabbay et al. (2017), la composición química de los residuos de cacao muestra cantidades de nutrientes y fitonutrientes, que sugieren una prometedora reutilización como materia prima; con valores no tan lejanos a los reportados para los granos de cacao sin tostar de Ghana y Ecuador. Estos autores reportaron un contenido de flavonoides totales ($68,00 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) superior a los obtenidos en este estudio (54).

Los valores obtenidos demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las dos variedades de procedencia del mucílago de cacao; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Demostrándose que existe un efecto de la variedad de cacao en el contenido de polifenoles totales del mucílago, con un valor $p_{\text{calculado}}$ (0,000002) inferior al valor $p_{\text{crítico}}$ (0,05).

4.1.7. Contenido de vitamina C

La vitamina C es un compuesto antioxidante presente generalmente en todas las frutas; por lo que, es considerada una de las principales responsables de la actividad antioxidante de las mismas. Con la finalidad de descartar el efecto funcional de esta vitamina, en las muestras de mucílago de cacao, se procedió a determinar la presencia de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos, empleado cromatografía líquida de alta resolución HPLC. Los cromatogramas obtenidos en este estudio se muestran en la Figura 13.

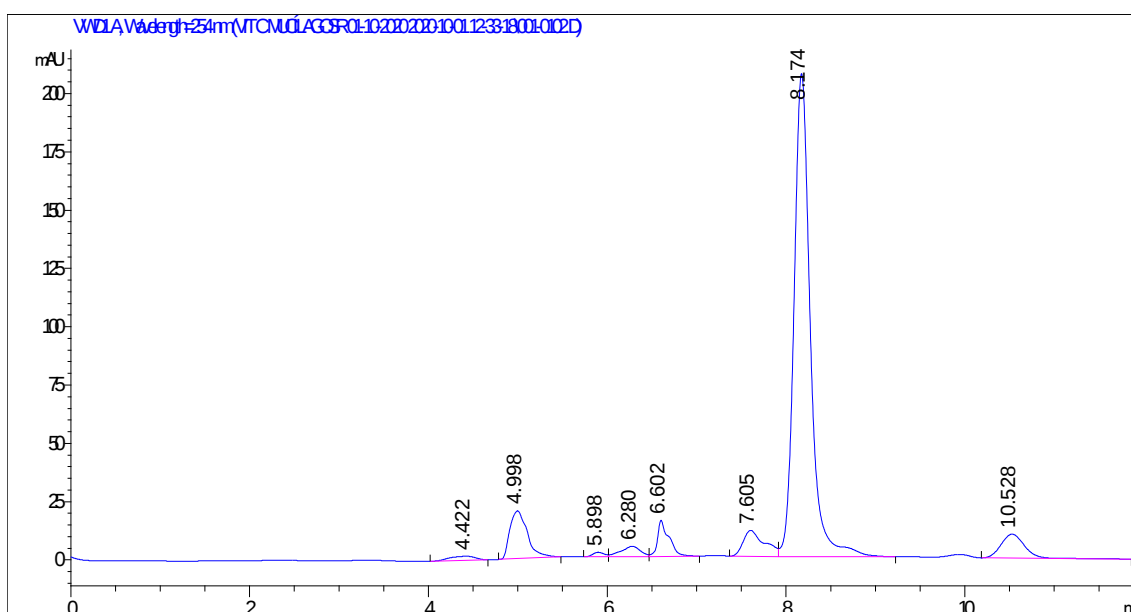


Figura N. 13 Cromatograma de análisis de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos en mucílago de cacao CCN-51, por cromatografía HPLC

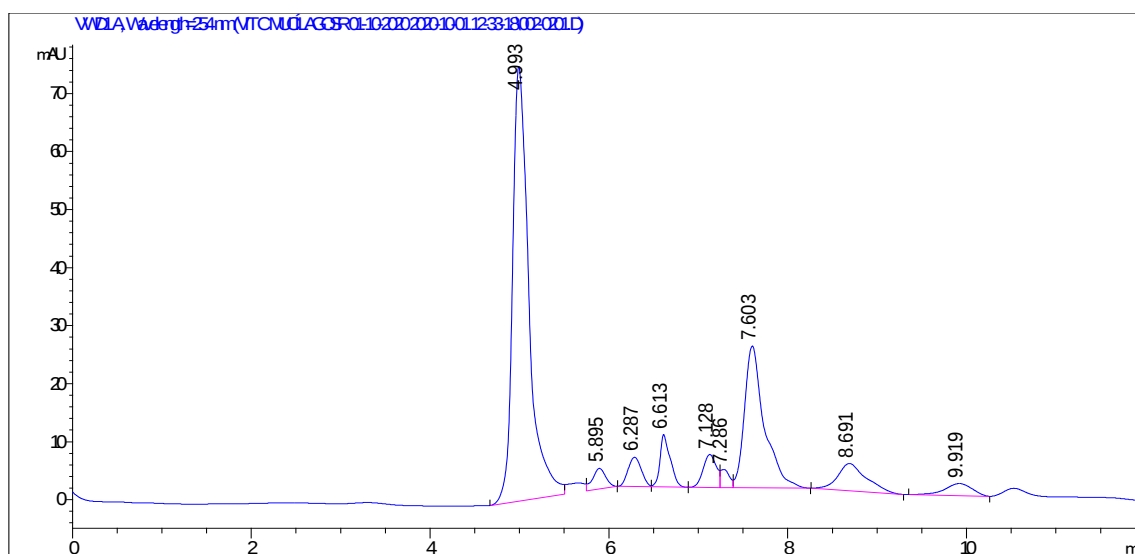


Figura N. 14 Cromatograma de análisis de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos en mucílago de cacao Nacional, por cromatografía HPLC

La vitamina C es un compuesto que se encuentra presente en las mayorías de las frutas; sin embargo, en los cromatogramas obtenidos en este trabajo de investigación se confirmó la ausencia de este compuesto en las muestras de mucílago de las variedades de cacao CCN-51 y Nacional, tal como lo muestra en la Figura 13 y 14.

Según estos resultados, los picos cromatográficos encontrados en las muestras, corresponden a ácido oxálico, ácido cítrico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido fumárico; esperándose que, el ácido ascórbico aparezca entre los primeros 3 minutos de análisis (tiempo de retención 2,7 minutos). Confirmando los resultados presentados por Vásquez (2019), quien reporto valores de $3,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido málico, $1,23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ácido láctico; $1,27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ácido oxálico; $9,14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ácido cítrico y $2,28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido acético (21).

Según Quiñones et al (2012), los compuestos fenólicos son omnipresentes en las plantas, y cuando se consumen alimentos vegetales, estos fitoquímicos contribuyen a la ingesta de antioxidantes naturales en la dieta humana. Para este autor, los subproductos agroindustriales son buenas fuentes de compuestos fenólicos y se han explorado como fuente de antioxidantes naturales. Por lo que, la actividad antioxidante del mucílago de cacao podría atribuirse a la presencia de polifenoles y flavonoides (4)

En la Tabla 9, se presenta los resultados del análisis de correlación de Pearson entre los contenidos de polifenoles y flavonoides totales presentes en el mucílago de cacao y la actividad antioxidante medida por los métodos de ABTS, FRAP y ORAC. Para el análisis de correlación se tomó como referencia los valores de capacidad antioxidante del trabajo

presentado por Zhunio quien trabajo en la “Evaluación de la actividad antioxidante en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedades: CCN-51 y Nacional.

Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) de mucílago de cacao con la actividad antioxidante por ABTS, FRAP Y ORAC.

PARAMETROS	CORRELACIÓN	
	Polifenoles	Flavonoides
ABTS	0,9919	0,9990
FRAP	0,9944	0,9994
ORAC	0,9524	0,9462

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el análisis de correlación de Pearson, se pudo determinar que el contenido de polifenoles y flavonoides de las muestras de mucílago de cacao presentaron una correlación positiva perfecta ($r \geq 0,99$) con la capacidad antioxidante medida por los métodos de ABTS y FRAP. Esto demuestra que los compuestos antioxidantes juegan un papel importante para la salud humana; indicando que los fitonutrientes presentes en estos residuos del cacao pueden actuar como agentes biológicos cuya función es atrapar radicales libres (RL) presentes en nuestro organismo. Dado que estos dos métodos se basan en la reducción del complejo tripiridiltriazina férrica (TPTZ) y ABTS⁺, en presencia de antioxidantes como los compuestos fenólicos (55,56).

En el método de ORAC, existe una correlación positiva fuerte con el contenido de polifenoles ($r \geq 0,95$) y positiva moderada ($r = 0,50$ a $0,95$) en flavonoides totales; mismo que determina la capacidad de captar radicales peroxilo, unas de las especies reactivas del oxígeno (ROS) responsables del daño de proteínas, ADN, ARN, entre otros (55,56).

Según Martínez et al (2012), la actividad antioxidante de los coproductos del cacao podría atribuirse a los fitoquímicos que contienen compuestos polifenólicos (flavan-3-ol, monómeros de catequina y epicatequina, y dímeros de procianidina B₂). Estos autores encontraron una alta correlación entre el ensayo ABTS ($r = 0,965$ y $0,951$) y el contenido de polifenoles totales de los coproductos de cacao; repitiéndose el mismo comportamiento en el método de FRAP ($r = 0,988$ y $0,984$). Además, indicaron que la actividad biológica individual aumenta o disminuye con un efecto sinérgico o antagonista de los mismos; confirmando, los resultados obtenidos en este estudio (38).

En conclusión, los residuos de la cadena de beneficio del cacao pueden utilizarse como ingredientes alimentarios intermedios (IFI) en el desarrollo de productos funcionales por su interesante actividad antioxidante. Su aprovechamiento permite aportar valor agregado a este valioso coproducto industrial; dando lugar a nuevos productos farmacéuticos, médicos, nutracéuticos o alimentos funcionales. Además, constituye una manera de optimizar los costos de las actividades de beneficio de cacao, mediante la implementación de economía circular y los posibles daños del medio ambiente (54).

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.2. Conclusiones

- Las muestras de mucílago de cacao presentaron un alto contenido de polifenoles en las variedades CCN-51 (72,22 mg AGE•100 mL⁻¹) y Nacional (105,08 mg AGE•100g⁻¹); y en cuanto a flavonoides los valores fueron de 5,16 mg•100 mL⁻¹ para la variedad CCN-51 y 36,8 mg•100 mL⁻¹ en la variedad Nacional; siendo superior el contenido fenólico en esta última muestra. Además, estas muestras carecen de vitamina C; puesto que el ácido ascórbico no es parte del perfil de ácidos orgánicos del exudado de cacao.
- En las dos variedades de mucílago de cacao, el análisis de correlación de Pearson demostró que existe una correlación positivamente perfecta (> 99%) entre el contenido de polifenoles y flavonoides totales con la actividad antioxidante, medida por los métodos de ABTS⁺ y FRAP. Mientras que, en el método de ORAC, la correlación es moderada (r=0,5 a 0,95).
- Se comprobó que existe un efecto de la variedad sobre contenido fenólico del mucílago de cacao, encontrándose valores superiores en las muestras procedentes de cacao Nacional que en el cacao CCN-51, tanto para polifenoles como para flavonoides.
- El mucílago de cacao de la variedad Nacional tiene un mejor perfil en cuanto al contenido de polifenoles y flavonoides totales con una variación aproximada del 45% más que la variedad CCN-51.
- Los residuos generados durante las postcosechas y la industrialización del grano de cacao pueden ser aprovechado en la industria alimentaria en el desarrollo de alimentos funcionales, mejorando el perfil nutracéutico de alimentos de bajo valor biológico como los productos de confitería, panadería, aderezos, snacks. Dando lugar a productos funcionales que cada vez se están abriendo más camino en el mercado.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un estudio integral de los residuos generados por postcosecha del cacao con la finalidad de implementar una política cero residuos en el sector de beneficio de cacao.
- Considerar el estudio de diferentes metodologías para separar el azúcar de los compuestos antioxidantes del mucílago de cacao antes del proceso de microencapsulación.
- Estudiar diferentes métodos de disminución del contenido de agua en los exudados de cacao, con la finalidad de incrementar la concentración de componentes bioactivos en la muestra.
- Realizar un estudio económico con la finalidad de establecer el costo de producción para la obtención de componentes bioactivos a partir del mucílago de cacao.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

6.1. Bibliografía

1. Tirado-Gallego PA, Lopera-Álvarez A, Ríos-Osorio LA. Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: Revisión sistemática. Vol. 17, Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica; 2016. p. 417–30.
2. Amable C, Torres V, Ocampo RD, Rodríguez WM, Velasco RS. Utilización del mucílago de cacao, tipo nacional y trinitario , en la obtención de jalea cocoa mucilage from nacional and trinitario. 2016;7(1):51–8.
3. Chafla AL, Rodríguez Z, Boucourt R, Torres V. Caracterización bromatológica de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*), procedente de siete cantones de la Amazonia, Ecuador. Cuba J Agric Sci. 2016;50(2):245–52.
4. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. Nutr HospNutr Hosp. 2012;2727(1):76–8976.
5. Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragozá-Arnáez F, Moreno L, et al. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. J Pharmacol Exp Ther. 2002;302(1):66–72.
6. OMS. Enfermedades cardiovasculares. [Internet]. 2015. Available from: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/
7. Del Mucílago Cacao U DE, Nacional Trinitario TY, Obtención De Jalea E LA, Amable Vallejo Torres C, Díaz Ocampo R, Morales Rodríguez W, et al. COCOA MUCILAGE FROM NACIONAL AND TRINITARIO VARIETIES FOR COCOA JELLY PRODUCTION RESUMEN.
8. Gboghri G, Gboghri G. Impact de la fermentation sur les propriétés antioxydantes , anti-inflammatoires et immunomodulatrices du cacao To cite this version : HAL Id : tel-02481217 DE L ' UNIVERSITÉ DE M ONTPELLIER IMPACT DE LA FERMENTATION SUR LES PROPRIETES Présentée par Guehi. 2020;
9. ANECACAO. Estadísticas actuales Anecacao Ecuador. 2015. p. 6.

10. Alarcón JJ, Arevalo E, Díaz AL, Galindo JR, Rosero AA. Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) Medidas para la temporada invernal. 2012 [cited 2019 Nov 29];5. Available from: <http://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/-nbsp;M;anejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Cacao.aspx>
11. Alarcón JJ, Arevalo E, Díaz AL, Galindo JR, Rosero AA. Manejo fitosanitario del cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) Medidas para la temporada invernal. 2012;5. Available from: <http://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/-nbsp;M;anejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Cacao.aspx>
12. De Tarso Alvim P. *Theobroma cacao*. Vol. 5, CRC Handbook of Flowering. 2018. 357–365 p.
13. Jaime Vera francisco mite. INIAP - Estación Experimental Pichilingue INIAP - Estación Experimental Pichilingue. 1998;33–6.
14. Arteaga Estrella Y. Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón Naranjal (Provincia del Guayas). ECA Sinerg. 2013;4(1):49–59.
15. Mauricio F, Gil J, Roció M Del, Culqui B, Tesis D. Universidad Estatal de Bolivia Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente Escuela de Ingeniería Agroindustrial. 2012.
16. Carlos Valarezo-García, David Jaramillo Abril PDD, Patricio Vásconez Andrade FFO. The Ecuadorian Amazon and its ancestral knowledge; the use of the bark extract from the Piwi tree (*Pictocoma discolor*) a singular knowledge in ophidic accidents. Rev Mex Cienc Farm. 2016;4(47):26–34.
17. Chalé FH, Ancona DB, Campos MRS. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. Vol. 29, Nutricion Hospitalaria. 2014. p. 10–20.
18. Lino KA, Herrera Rodríguez J, Solano MQ, Silva CE, Sedano NV, Orihuela Vásquez W. EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE TRES COLORES DE PÉTALOS DE MASTUERZO (*Tropaeolum majus* L.) EVALUATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF THREE COLOR PETAL CRESS (*Tropaeolum majus* L.).

19. Bastías Montes JM, Cepero B. Y. La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos [Internet]. Vol. 43, Revista Chilena de Nutricion. Sociedad Chilena de Nutricion Bromatologia y Toxilologica; 2016 [cited 2020 Sep 3]. p. 81–6. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182016000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
20. Aguascalientes DE. Investigación y Ciencia DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA.
21. Hipólito-Romero E, Carcaño-Montiel MG, Ramos-Prado JM, Vázquez-Cabañas EA, López-Reyes L, Ricaño-Rodríguez J. Effect of mixed edaphic bacterial inoculants in the early development of improved cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) in a traditional agroforestry system of Oaxaca, Mexico. *Rev Argent Microbiol.* 2017;49(4):356–65.
22. Rios F. Estrategia país para la oferta de cacao especiales políticas e iniciativas privadas en el Perú, Ecuador, Colombia y Republica Dominicana. 2017;13.
23. Acebo Plaza SECCIÓN VISIÓN Jorge Rodríguez DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN Jonathan Quijano -UGA Diseño Publicidad ESPOL MA. Estudios Industriales [Internet]. 2016 [cited 2020 Jan 14]. Available from: <http://www.espae.espol.edu.ec/publicaciones-de-espae/>
24. PRO Ecuador. Análisis del sector cacao y elaborados. 2013.
25. ANECACAO. Actualidad y perspectiva del sector cacaotero en Ecuador [Internet]. 2014 [cited 2020 Jan 9]. Available from: <http://anecacao.com/uploads/2014/09/1-El-Ecuador-Actualidad-y-Perspectivas-del-Sector-Cacaotero-ANECACAO-cumbre-mundial-del-cacao-2014.pdf>
26. Abbott P. Análisis de la cadena productiva del cacao en Colombia. 2019 [cited 2020 Mar 30];10. Available from: http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/f-taxonomia_plantas/f01-cultivo/2018/cadena_cacao_nov188.pdf
27. Cedeño Sergio. CMAA Internacinal Cocoa Conference LA REVOLUCIÓN DEL CACAO CCN-51 EN ECUADOR. 2011;25–6.
28. Anecacao. Sector exportador de cacao y su importancia económica [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 30]. p. 8. Available from:

<http://www.anecacao.com/uploads/estadistica/cacao-ecuador-2019.pdf>

29. CFN. Ficha sectorial: CULTIVO DE CACAO-ELABORACIÓN DE CACAO, CHOCOLATE. 2018.
30. FAO. Cacao. 2018;
31. Secretaría Técnica del Comité Interinstitucional para el Cambio de la Matriz Productiva- Vicepresidencia del Ecuador. Diagnóstico de la Cadena Productiva del Cacao en el Ecuador. 2015.
32. Infocacao. Actividad de postcosecha para lograr un cacao de calidad. 2017.
33. Aguilar H, Lima L, Septiembre De CA, Suiza C. Guía de Buenas Prácticas de Poscosecha de Cacao HELVETAS Swiss Intercooperation HONDURAS FUNDACIÓN HELVETAS HONDURAS Schweizerische Eidgenossenschaft Confédération suisse Confederazione Svizzera Confederaziun svizra HELVETAS Swiss Intercooperation HONDURA. 2017;9.
34. Ayestas E, Vega-Jarquín C, Torres P, Lanzas J, Orozco L, Astorga C. Puntos críticos del manejo poscosecha de cacao en Waslala, Nicaragua. La Calera. 2016;14(22):5–12.
35. Ortiz de Bertorelli L, Graziani De Farinas L, Rovedas L. G. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. Agron Trop. 2009;59(2):119–27.
36. Kalvatchev Z, Garzaro D, Guerra Cedezo F. Theobroma cacao L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Rev Agroaliment. 1998;4(6):23–5.
37. Tapia García K. Evaluación del mucílago y placenta de dos variedades de cacao (Theobroma cacao L.) aplicando dos métodos conservantes en la obtención de mermelada. 2016;1–104.
38. Martínez R, Torres P, Meneses MA, Figueroa JG, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (Theobroma cacao L.) co-products. Food Res Int. 2012;49(1):39–45.
39. Vásquez ZS, de Carvalho Neto DP, Pereira GVM, Vandenberghe LPS, de Oliveira PZ, Tiburcio PB, et al. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A

- review. *Waste Manag.* 2019;90:72–83.
40. Mexicana AF, México AC, Serrano D, López López E, Sainz M, Del Rosario T. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*
 41. Serra D, Almeida LM, Dinis TCP. Polyphenols as food bioactive compounds in the context of Autism Spectrum Disorders: A critical mini-review. Vol. 102, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* Elsevier Ltd; 2019. p. 290–8.
 42. Russo GL, Spagnuolo C, Russo M, Tedesco I, Moccia S, Cervellera C. Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. *Biochem Pharmacol.* 2019;113719.
 43. Maydata G. *Chocolate, Polifenoles y proteccion en la salud.* 2010.
 44. Quinaluisa D. Microencapsulación de componentes bioactivos de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) mediante secado por aspersion. Universidad Técnica de Ambato; 2018.
 45. Figueroa PM, Ceballos MA, Hurtado AM. Microencapsulação por secagem por atomização de óleo de amora (*Rubus glaucus*) extraído com CO₂ supercrítico. *Rev Colomb Quim.* 2016;45(2):39–47.
 46. Llerena W, Ang I, Brito B, Ortiz B. Biocompounds Content Prediction in Ecuadorian [Internet]. Vol. 8, *Foods.* 2019. Available from: <https://doi.org/10.3390/foods8080284>
 47. Sandoval S. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos.” Sección Me. Ambiental D de S, editor. Santiago, Chile; 2010. 3–70 p.
 48. Espín, S; Samaniego I. Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao. 2016;
 49. BUSHWAY RJ, BUREAU JL, MCGANN DF. Determinations of Organic Acids in Potatoes by High Performance Liquid Chromatography. *J Food Sci.* 1984;49(1):76–7.
 50. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ, Jesús Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutr Hosp.*

2002;(6):271–8.

51. Naczek M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(5):1523–42.
52. Samaniego I, Espín S, Quiroz J, Ortiz B, Carrillo W, García-viguera C. Efecto del área de cultivo sobre el contenido de metilxantinas y flavan-3-o en granos de cacao de Ecuador. 2020;1–17.
53. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ, Jesús Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;(6):271–8.
54. Gabbay Alves TV, Silva da Costa R, Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P, Pinheiro Arruda MS, et al. Bioactive compounds and antioxidant potential for polyphenol-rich cocoa extract obtained by agroindustrial residue. *Nat Prod Res.* 2019;33(4):589–92.
55. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal Methods.* 2009;2(1):41–60.
56. Pérez-Jiménez J. Metodología para la Evaluación de Ingredientes Funcionales Antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. 2011;272. Available from: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1671/6494_perez_jimenez_jara.pdf?sequence=1

CAPITULO VII

ANEXOS

7.1. Anexo 1. Análisis FODA.

