



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Anteproyecto de Investigación
previo a la obtención del título
de Ingeniera en Alimentos

Unidad de Integración Curricular:

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CASCARILLA DE
CACAO (*Theobroma cacao* L.) PROVENIENTES DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y
NACIONAL POR DISTINTOS MÉTODOS”

Autora:

Zomayra Judith Coronel Álvarez

Tutora de la Unidad de Integración Curricular:

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

Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua M. Sc. (INIAP)

Mocache – Los Ríos – Ecuador

2021



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Zomayra Judith Coronel Álvarez**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para 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 institucional vigente.

f. _____

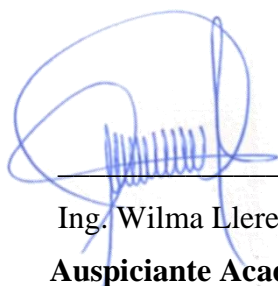
Zomayra Judith Coronel Álvarez

C.C. # 1207536317

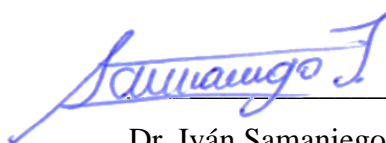


CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Los suscritos, **Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, M. Sc.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Directora; **Dr. Iván Samaniego Maigua, M. Sc.**, Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Co-Director de la Unidad de Integración Curricular **CERTIFICAMOS** que la estudiante **Zomayra Judith Coronel Álvarez**, realizó de la Unidad de Integración Curricular titulada **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) PROVENIENTES EN LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL POR DISTINTOS METODOS”**, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, bajo nuestra 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.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Directora; **Dr. Iván Samaniego Maigua, M. Sc.**, Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Co-Director de la Unidad de Integración Curricular titulada: **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) PROVENIENTES EN LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL POR DISTINTOS METODOS”** de autoría de la estudiante **Zomayra Judith Coronel Álvarez**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 5% el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

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

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



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Título

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) PROVENIENTES EN LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL POR DISTINTOS METODOS”

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

Aprobado por:

Ing. Christian Vallejo Torres
PRESIDENTE DE TRIBUNAL

Ing. Carol Coello Loor
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Dra. María Teresa Pacheco
MIEMBRO DE TRIBUNAL

MOCACHE- LOS RÍOS- ECUADOR

2021

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidades, por saber brindarme una vida llena de aprendizaje y experiencia. Le doy gracias a mis padres Magda Álvarez y Arturo Coronel que con su apoyo me supieron guiar en el camino del bien, y por apoyarme en todo momento de mi vida, estar conmigo y nunca dejarme sola. A mis hermanos Alisson, Zuleyca, Arturo, y Mateo por ser parte importante de mi vida, representar la unión familiar y llenar mi vida de alegría y amor. A mi esposo Iván Cortez por estar en todo momento de mi camino universitario, gracias por tu apoyo, y a mi hija Ainhoa que es mi fortaleza para seguir. A mi familia; en general son todos muy importantes en mi vida y en mi camino profesional. A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por abrirme las puertas para poder seguir mis estudios y formarme como una gran profesional. Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mi Tutora de Proyecto de Investigación Ing. Wilma Llerena Silva, y al Dr. Iván Samaniego Maigua por haber compartido experiencia y conocimiento y sobre todo su linda amistad. Y a mis amigos les agradezco por su linda amistad; Melissa que siempre estuvo desde el principio y siempre, te deseo lo mejor, y a los demás Byron, Billy, Yander, Ariana, gracias por esa amistad incondicional.

Zomayra Coronel Álvarez

DEDICATORIA

Este proyecto de investigación se lo dedico con mucho amor a mi madre Magda Álvarez Vera, que siempre estuvo conmigo en mis momentos más difíciles y guiarme por el mejor camino. A mi esposo Iván Cortez, compañero de vida y padre de mi hija gracias por las cosas que has hecho por mí y tu apoyo. A mi hija, Ainhoa Cortez Coronel, por ser mi fortaleza para seguir; a mis hermanos Alisson, Zuleyca, Arturo, Mateo, por apoyarme, espero ser un ejemplo para ustedes, a mi familia Álvarez y por último pero no menos importante, a mis amigos.

Zomayra Coronel Álvarez

RESUMEN EJECUTIVO

En la actualidad, en Ecuador existe una importante producción y exportación de cacao gracias a la excelente calidad de las almendras (aroma y sabor único, composición nutricional), lo que, conlleva a una mayor demanda a nivel nacional como internacional. Según diversas investigaciones realizadas sobre el cacao, se ha demostrado que las almendras y sus derivados contienen una fuente potencial de antioxidantes (polifenoles, flavanoles, teobromina, cafeína, etc), los cuales son sustancias químicas que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias en el organismo humano. Por esta razón el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional por los métodos ABTS, FRAP y ORAC. Para lo cual se utilizó la prueba “t” de Student y correlación de Pearson con la finalidad de comparar el contenido de antioxidantes con la actividad antioxidante. En la cascarilla de cacao variedad CCN-51 se obtuvieron valores de 626.62, 768.0 y 227.22 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ en los métodos ABTS, FRAP y ORAC, respectivamente; mientras en la variedad Nacional, los valores obtenidos fueron de 433.66, 639.51 y 209.87 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ en los métodos ABTS, FRAP y ORAC. El análisis permitió observar que en los métodos ABTS y FRAP existió correlación positiva a nivel de Epicatequina, mientras que a nivel de Catequina, Cafeína y Teobromina la correlación fue negativa. Para el método ORAC la correlación fue negativa respecto a todos los antioxidantes evaluados.

Palabras clave: *Capacidad antioxidante, fitonutrientes, radicales libres, residuos, valorización de residuos*

ABSTRACT

At present, in Ecuador there is an important production and export of cocoa thanks to the excellent quality of the almonds (aroma and unique flavor, nutritional composition), which leads to a greater demand both nationally and internationally. According to various investigations carried out on cocoa, it has been shown that almonds and their derivatives contain a potential source of antioxidants (polyphenols, flavanols, theobromine, caffeine, etc.), which are chemical substances that are characterized by preventing or delaying the oxidation of various substances in the human body. For this reason, the objective of this research was to determine the antioxidant activity of the cocoa husk of the CCN-51 and Nacional varieties by the ABTS, FRAP and ORAC methods. For which the Student's "t" test and Pearson's correlation were used in order to compare the antioxidant content with the antioxidant activity. In the cocoa shell variety CCN-51, values of 626.62, 768.0 and 227.22 $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$ were obtained in the ABTS, FRAP and ORAC methods, respectively; while in the Nacional variety, the values obtained were 433.66, 639.51 and 209.87 $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$ in the ABTS, FRAP and ORAC methods. The analysis allowed to observe that in the ABTS and FRAP methods there was a positive correlation with Epicatechin, while with Catechin, Caffeine and Theobromine, the correlation was negative. For the ORAC method, the correlation was negative with respect to all the antioxidants evaluated.

Keywords: *Antioxidant capacity, phytonutrients, free radicals, waste, waste recovery*

Tabla de contenido

Introducción.....	1
CAPÍTULO I.....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de la investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
Diagnóstico.....	4
Pronóstico.....	5
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo general.....	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. Justificación.....	6
CAPÍTULO II.....	7
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.1. Marco conceptual.....	8
2.2. Marco referencial.....	10
2.2.1. Generalidades del cacao.....	10
2.2.1.1. Taxonomía.....	10
2.2.2. Cacao en Ecuador.....	11
2.2.3. Variedades de cacao.....	11
2.2.3.1. Cacao Nacional.....	11
2.2.3.2. Cacao Criollo.....	12
2.2.3.3. Cacao Forastero.....	13
2.2.3.4. Cacao Trinitario.....	13
2.2.3.5. Cacao CCN-51.....	14
2.2.4. Proceso post cosecha del cacao.....	15

2.2.4.1.	Tostado.	16
2.2.4.2.	Calidad de los granos de cacao.	17
2.2.5.	Residuos de la cadena de beneficio del cacao.	17
2.2.5.1.	Cáscara de la mazorca.	17
2.2.5.2.	Placenta de cacao.	18
2.2.5.3.	Mucílago de cacao.	18
2.2.5.4.	Cascarilla de cacao.	18
2.2.6.	Valorización de residuos.	20
2.2.6.1.	Antioxidantes.	21
2.2.6.2.	Polifenoles.	21
2.2.6.3.	Flavonoides.	21
2.2.7.	Capacidad antioxidante.	22
2.2.8.	Métodos de determinación de la capacidad antioxidante.	22
2.2.8.1.	Método ABTS.	22
2.2.8.2.	Método ORAC.	23
2.2.8.3.	Método FRAP.	23
CAPÍTULO III		24
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.		24
3.1.	Localización.	25
3.2.	Tipos de investigación.	25
3.2.1.	Investigación exploratoria.	25
3.2.2.	Investigación experimental.	25
3.3.	Métodos de la investigación.	26
3.3.1.	Método inductivo-deductivo.	26
3.4.	Fuentes de recopilación de información.	26
3.5.	Diseño de la investigación.	26

3.5.1.	Esquema del ANDEVA.	27
3.6.	Instrumentos de la investigación.	28
3.6.1.	Muestreo.....	28
3.6.2.	Fermentación.....	29
3.6.3.	Preparación de la muestra.....	29
3.6.4.	Actividad antioxidante	30
3.6.4.1.	Extracción.....	30
3.6.4.2.	Validación de los métodos.....	30
a)	Linealidad.....	30
b)	Limites de detección y cuantificación.....	31
c)	Exactitud.	31
d)	Precisión.....	31
3.6.4.3.	Cuantificación.....	32
a)	Método del ABTS	32
b)	Método del FRAP	32
3.6.4.4.	Actividad antioxidante ORAC.....	32
3.7.	Recursos humanos y materiales.....	33
3.7.1.	Recursos humanos.....	33
3.7.2.	Materiales.....	33
3.7.2.3.	Reactivos.	34
3.7.2.4.	Equipos.	35
CAPÍTULO IV		36
RESULTADOS Y DISCUSIONES		36
4.1.	Validación de los métodos.....	37
4.1.1.	Linealidad.....	37
4.1.2.	Límites de detección y cuantificación.....	39

4.1.3.	Exactitud.....	40
4.1.4.	Precisión.	41
4.2.	Capacidad antioxidante.....	43
4.2.1.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	43
4.2.2.	Coefficiente de correlación de Pearson.	49
CAPITULO V		51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		51
5.1.	Conclusiones.....	52
5.2.	Recomendaciones.	52
CAPITULO VI.....		53
BIBLIOGRAFÍA.....		53
6.1.	Literatura citada.	54

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cacao. _____	10
Tabla 2. Requisitos técnicos del cacao _____	17
Tabla 3. Composición proximal de los residuos de cacao _____	19
Tabla 4. Residuos y componentes funcionales del cacao _____	20
Tabla 5. Localización del trabajo experimental _____	25
Tabla 6. Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) sobre el contenido de actividad antioxidante. _____	27
Tabla 7. Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) sobre el contenido de actividad antioxidante en cascarilla de cacao. _____	27
Tabla 8. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas. _____	28
Tabla 9. Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración Trolox para la validación de los métodos de actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC _____	37
Tabla 10. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de la actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC. _____	39
Tabla 11. Coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC. _____	49

Índice de figuras

Figura 1. Granos de cacao tostado _____	2
Figura 2. Cacao Nacional _____	12
Figura 3. Cacao Criollo _____	12
Figura 4. Cacao Forastero _____	13
Figura 5. Cacao Trinitario _____	14
Figura 6. Cacao CCN-51 _____	15
Figura 7. Ecuación de Horwitz _____	32
Figura 8. Curvas de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C) _____	38
Figura 9. Porcentaje de extracción para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C) _____	40
Figura 10. Repetitividad del método para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C) _____	42
Figura 11. Capacidad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C) de la cascarilla de Cacao CCN-51 y Nacional _____	44
Figura 12. Compuestos fenólicos de la cascarilla de dos variedades de cacao, Arreaga (2020) _____	48
Figura 13. Metilxantinas de la cascarilla de dos variedades de cacao, Arreaga (2020) _____	49

Índice de anexos

Anexo 1. FODA del problema	62
Anexo 2. Evidencias gráficas del proceso.....	63
Anexo 3. Prueba t de Student aplicada en la determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), proveniente de las variedades CCN-51 y Nacional por el método ABTS	65
Anexo 4. Prueba t de Student aplicada en la determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), proveniente de las variedades CCN-51 y Nacional por el método FRAP.....	66
Anexo 5. Prueba t de Student aplicada en la determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), proveniente de las variedades CCN-51 y Nacional por el método ORAC.....	66

CÓDIGO DUBLÍN

Título	“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CASCARILLA DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) PROVENIENTE DE LAS VARIETADES CCN-51 Y NACIONAL POR DISTINTOS MÉTODOS”
Autor	Coronel Álvarez Zomayra Judith
Palabras claves	Capacidad antioxidante, fitonutrientes, radicales libres, residuos, valorización de residuos.
Editorial	Quevedo. UTEQ, 2021
Resumen	<p>En la actualidad, en Ecuador existe una importante producción y exportación de cacao gracias a la excelente calidad de las almendras (aroma y sabor único, composición nutricional), lo que, conlleva a una mayor demanda a nivel nacional como internacional. Según diversas investigaciones realizadas en cacao, se ha demostrado que las almendras y sus derivados constituyen una fuente potencial de antioxidantes, compuestos químicos que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias en el organismo. Por esta razón el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional por los métodos ABTS, FRAP y ORAC. Se utilizó la prueba “t” de Student y correlación de Pearson, con la finalidad de comparar el contenido de antioxidantes, con la actividad antioxidante. En la cascarilla de cacao variedad CCN-51 se obtuvieron valores de 626.62, 768.0 y 227.22 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ con los métodos ABTS, FRAP y ORAC, respectivamente. Mientras en la cascarilla de la variedad Nacional, los valores obtenidos fueron de 433.66, 639.51 y 209.87 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ al aplicar los métodos ABTS, FRAP y ORAC.</p>
Descripción	83 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URL	

Introducción

El Ecuador es uno de los principales países productores de cacao en el mundo; sin embargo, su representación en el mercado chocolatero y de productos derivados del cacao (chocolates, tabletas, té, licor entre otros productos) es muy bajo. Según los registros de la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao (ANECACAO), la producción de chocolates representa únicamente el 0.8% (1100 Tm) de la producción de cacao (1).

El país es el octavo productor de cacao a nivel mundial, de diferentes variedades y se ubica en primer lugar en el cultivo de cacao fino de aroma, cubriendo el 50% de la demanda de este pequeño pero importante segmento del mercado mundial. Por la calidad de sus almendras, el cacao fino es ampliamente apreciado en el mercado chocolatero; siendo la variedad Arriba un tipo de cacao único en el mundo que ha permitido alcanzar un sitio privilegiado al cacao ecuatoriano (2).

De acuerdo con ANECACAO, el cacao es uno de los principales productos tradicionales de exportación ecuatoriana. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), el sector cacaotero contribuye con el 5% de la población económicamente activa nacional (PEA) y el 15% de la PEA rural, constituyendo una base fundamental de la economía familiar costera del país.

En cuanto a la fabricación de productos a base de cacao, el rendimiento de 100 Kg de semillas de cacao es alrededor de 85%, siendo el valor restante considerado como residuo. De estos residuos, solo la cascarilla de cacao corresponde aproximadamente al 12%. Dentro de sus límites nutricionales se encuentra el contenido de teobromina 1%, la que muchas veces puede restringir su uso para el consumo (3).

Según diversas investigaciones realizadas en cacao, se ha demostrado que las almendras y sus derivados contienen una fuente potencial de nutrientes y fitonutrientes. En el caso de los desechos generados durante el proceso de beneficiado del cacao (cascarilla, baba o mucilago) estos pueden convertirse en una fuente potencial de componentes novedosos y beneficiosos para el ser humano conocidos como antioxidantes (4).

Los antioxidantes son sustancias químicas que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias en el organismo humano. Esta oxidación puede provocar alteraciones fisiológicas importantes, que desencadenan en diversas enfermedades (5). A

través de estos componentes se pretende atender al creciente interés por el consumo de alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud (1) (4).

En los últimos años existe un creciente interés por el estudio de componentes naturales considerados como desechos o residuos de la industria agroalimentaria. En el caso de la cadena de beneficio del cacao, la biomasa residual que se genera en la postcosecha y procesamiento produce una gran cantidad de desechos que se puede aprovechar como materia prima para el desarrollo de otros productos.

La importancia de estos componentes antioxidantes en los residuos del cacao se debe a que su consumo aporta beneficios para la salud por su efecto en el desempeño de funciones fisiológicas, antioxidantes y antimutagénicas (6) (7). A partir de la cascarilla de cacao se puede obtener extractos con gran capacidad antioxidante, ricos en polifenoles, flavonoides, taninos y terpenoides que le aportan propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antitrombóticas y antimutagénicas (8).



Figura 1. Granos de cacao tostado
Fuente: Autor

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

Diagnóstico.

La biomasa residual que se genera durante la postcosecha y procesamiento del cacao representa una problemática ambiental para los productores locales en todo el mundo. De tal manera que actualmente se busca la reducción del volumen de desperdicios en la producción primaria e industrial evitando descargar los residuos en el campo donde se cultiva, fermentan o procesan las almendras de cacao. La tendencia mundial actual es el desarrollo de investigaciones en residuos de la industria agroalimentaria para la obtención de productos de alto valor agregado. Este proceso se conoce como valorización de residuos y se implementa mediante la aplicación de economía circular.

En el caso de la industria cacaotera se pueden utilizar materiales no comestibles de bajo costo como los tallos, hojas y cáscaras (mazorcas y almendras) para la extracción de fitonutrientes naturales como los componentes fenólicos, ampliamente utilizados en el desarrollo de productos funcionales por lo que, a pesar de los beneficios de la valorización de residuos, en el Ecuador la investigación acerca de la caracterización fitoquímica de los residuos del cacao es deficiente y junto con la falta de tecnología para el procesamiento industrial de los componentes bioactivos provoca desinterés por parte de las empresas agroalimentarias para invertir en la implementación de una política cero residuos, prefiriendo desecharlos en vertederos o en el campo.

Por otro lado, existe el creciente interés por el consumo de alimentos con efectos benéficos para la salud; como los alimentos funcionales; sin embargo, presentan un costo mayor frente a un alimento convencional. Esto se debe a que el bajo nivel de tecnificación en la industrialización de cacao (procesos artesanales) impide a los industriales competir con productos no saludables de muy bajo costo y con mayor presencia de publicidad en el mercado nacional.

A pesar de los beneficios de la valorización de residuos, en el Ecuador; sin embargo, la deficiente la investigación acerca de la caracterización fitoquímica de los residuos del cacao es deficiente y junto con la falta de tecnología para el procesamiento industrial de los componentes bioactivos provoca la falta de interés por parte de las empresas

agroalimentarias para invertir en la valorización de residuos, implementación de una política cero residuos, prefiriendo desecharlos en vertederos o en el campo.

Pronóstico.

El cacao es de gran importancia en las actividades agrícolas del Ecuador, donde la mayor dificultad se presenta en el aprovechamiento de sus residuos agroindustriales. Por lo que, al no realizarse la caracterización de la cascarilla de cacao, se perderá valiosa información sobre sus propiedades antioxidantes. De igual manera se incrementará el nivel de contaminación ambiental en los entornos asociados con la actividad cacaotera, propagando enfermedades en los cultivos y atrayendo plagas.

Además de esto, se limitará el uso de cascarilla de cacao como fertilizante y alimentos de animales, lo que, evitará aprovechar su efecto benéfico para la salud a través de su aporte de antioxidantes naturales al organismo

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

Determinar la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de las variedades CCN51 y Nacional por distintos métodos.

1.2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto de la variedad sobre la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao.
- Correlacionar la actividad antioxidante con la composición fenólica de la cascarilla de dos variedades de cacao.
- Identificar los métodos más adecuados de extracción y conservación de los compuestos antioxidantes de la cascarilla de cacao.

1.3. Justificación.

La valorización de los residuos del sector agroalimentario incluye diferentes estrategias de gestión, que permiten aprovechar los residuos no comestibles como: tallo, hojas, cáscaras, entre otros. El objetivo es convertir la biomasa residual en derivados de valor agregado para ser utilizados en alimentos u otros sectores industriales.

El sector hortofrutícola es uno de los que genera grandes volúmenes de material residual, mismos que se utilizan muy poco. Dentro de este grupo, se ha identificado que la actividad cacaotera aprovecha únicamente el 10% del peso total del fruto; desechando la cáscara, cascarilla, mucílago, placenta y otros. La mayor parte de estos se los descarga directamente en el campo, convirtiéndose en un problema de índole ambiental, puesto que provoca la generación de malos olores, deterioro de paisaje y contaminación.

Además del impacto ambiental y la afectación a las plantaciones, se producen grandes pérdidas económicas en el sector donde se cultiva (2). La principal ventaja en este tipo de residuos es que son una fuente siempre disponible y barata, para producir derivados que presentan un alto valor agregado en el mercado potencial. En el caso del rubro cacaotero, la valorización de residuos ha tomado gran fuerza entre la comunidad científica, en donde el estudio se ha direccionado hacia procesos de transformación que generan subproductos que pueden ser útiles en otras actividades (4).

El propósito de la siguiente investigación es determinar la actividad antioxidante de dos variedades de cacao CCN-51 y Nacional por diferentes métodos, para el uso de microencapsulados que posteriormente se emplearán en el desarrollo de alimentos funcionales que son capaces de proteger el organismo de reacciones y procesos que puedan producir un efecto dañino, como es el caso de las especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

Antioxidante.

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Se produce una oxidación, cuando una especie cede electrones a otra. En este proceso la especie que gana electrones se reduce y la que pierde se oxida (9).

Antocianinas.

Son el grupo más importante de pigmentos solubles al agua visible para el ojo humano, forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos. Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos, se hallan en las células epidermales o subepidermales de la planta (9).

Capacidad antioxidante.

En la composición de la dieta juega un papel importante en el estrés oxidativo ya que puede contribuir tanto al daño oxidativo, como actuar sobre los mecanismos de defensa (10)

Cacao.

El cacao es un fruto originario de América tropical del alto Amazonas, su historia se remonta al tercer milenio antes de Cristo hace más de 2000 años. Civilizaciones del sur de México y Centroamérica fueron los primeros pueblos en reconocer y utilizar las valiosas cualidades de la almendra de cacao adaptándola a su alimentación diaria (11).

Cascarilla.

La cascara o cascarilla se entiende por la parte externa del grano limpio y en buen estado. Para su excelente conservación se almacena en lugares frescos y secos, con ventilación y que no esté expuesto al sol. La vida útil de la cascarilla depende de las condiciones de almacenamiento, ya que si se lo realiza adecuadamente la cascarilla puede conservarse hasta tres años sin ningún deterioro (12).

Radicales libres.

Los radicales libres (RL) son cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados. Estos son productos normales de muchas vías metabólicas y algunos existen en forma controlada (enjaulada) ya que realizan funciones esenciales dentro del organismo humano. Otros existen en forma libre e interactúan con varios componentes del tejido. Las interacciones de los RL son dañinas y están implicados en numerosos procesos patológicos que pueden causar disfunción aguda y crónica como cáncer, arteriosclerosis, entre otras (13) (14).

Polifenoles.

Los polifenoles que está presente en un alimento o ingrediente alimentario, que proporcionan nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación; pero, es importante conocer la cantidad de polifenoles que es biodisponible, dentro del contenido total de un alimento (15).

Flavonoides.

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (16).

Valorización de residuos.

Es un conjunto de alternativas que podrían emplearse para la gestión de los residuos agroalimentarios, dando lugar a numerosas posibilidades para la producción de subproductos de alto valor agregado, evitando la acumulación de materia orgánica en vertederos. Este procedimiento se basa en el uso de los desechos como un producto económico, rico en materiales orgánicos y fuente potencial de fitonutrientes (17) (18).

2.2. Marco referencial.

2.2.1. Generalidades del cacao.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) se considera un árbol nativo del trópico americano, especialmente de Mesoamérica (México, Guatemala y Honduras) Barazarte *et al.* (2008) (19) afirman que es muy probable que fueran los olmecas los responsables de su domesticación, hace tres mil años, pero se atribuye a los mayas la difusión de su uso, pues constituyó una parte importante de sus actividades culturales, como alimento, medicina e incluso como parte de su sistema económico moneda).

Arana y Rugel (2017) (2) describen que, entre los desechos del cacao, se tiene la mazorca del cacao, la cascarilla resultante de la semilla y el mucilago de cacao; los mismos que propiciamente tienen las características de poder ser reutilizados gracias a su considerable concentración de nutrientes, ya que al ser sometidos a un adecuado manejo pueden convertirse en fuentes de ingresos para los productores agrícola.

2.2.1.1. Taxonomía.

El cacao es una de las 22 especies del género *Theobroma*, su taxonomía es la siguiente (20):

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cacao.

Clasificación taxonómica <i>Musa x paradisiaca</i>	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Zingiberales
Familia	Malvales
Género	<i>Malvaceae</i>
Especie	Theobromeae

Fuente: Alberca-Peña (2018) (20)

2.2.2. Cacao en Ecuador.

Se conoce que la cultura del cacao en Ecuador es antigua, Anecacao (1) sostiene que cuando los españoles arribaron a la costa del Pacífico, ya se observaban grandes árboles de cacao, lo que demuestra el conocimiento y el uso de esta especie en la región costera, antes de la llegada de los europeos. Hoy en día, se cultivan algunos tipos de cacao en Ecuador, pero la variedad conocida como Nacional es la más buscada entre los fabricantes de chocolate, debido a la calidad de sus granos y la finura de su aroma.

Chiriboga (2013) (21) afirma que la producción tuvo su esplendor a fines del siglo XIX, lo que posicionó al país como el principal exportador del mundo en los años ochenta. Debido a este auge, el cacao es conocido en el país como el "grano de oro", al promover la mayor generación de divisas para Ecuador a fines del siglo XIX. Por las condiciones climáticas, en Ecuador se produce cacao primordialmente en las provincias del, Guayas, Los Ríos, Manabí y Sucumbíos (22).

Pero existen otras zonas del país que tienen un cacao diferente (CCN-51) y que ofrece otras cualidades, por ejemplo, la provincia de Napo, que produce volúmenes menores y no figura dentro del mapa cacaotero del país de cacao. Se cultivan algunos tipos de cacao, pero la variedad conocida como Nacional es la más buscada entre los fabricantes de chocolate, por la calidad de sus granos y la finura de su aroma (23).

En los últimos años, el 80% de la producción se concentra en la cuenca del río Guayas por la fertilidad de los suelos. En los últimos años se encuentra distribuido en 23 de las 24 provincias, siendo la Costa (Los Ríos, Guayas, Esmeraldas, El Oro y Manabí) y la Amazonía (Sucumbíos, Napo, Orellana y Zamora Chinchipe) donde existe más representatividad (20).

2.2.3. Variedades de cacao.

2.2.3.1. Cacao Nacional.

Este tipo de cacao es producido en el Ecuador, su fruto varía entre amarillo pálido y/o a amarillo intenso, su cáscara es bien rugosa por tanto sus surcos son bien definidos, tiene similitud o parentesco al cacao Criollo y Forastero, pero han realizado un estudio de marcadores moleculares lo que ha demostrado que este es un material diferente a pesar

de su parecido. Este fruto es utilizado en la repostería internacional en la preparación de chocolates selectos y gourmets.



Figura 2.Cacao Nacional
Fuente: Autor

2.2.3.2. Cacao Criollo.

Según la historia, el cacao Criollo fue cultivado y consumido por los mayas, quienes sembraban árboles de esta variedad en jardines o pequeñas plantaciones por toda América Central. Actualmente, las almendras de esta variedad son muy apetecidas por los expertos chocolateros por aportar un mejor sabor y aroma; sin embargo, existen problemas para el cultivo comercial de cacao Criollo, puesto que el manejo agronómico tiene un alto costo. Los frutos son de tamaño mediano, su principal característica es que tienen semillas de gran tamaño, de forma ovalada o cilíndrica (4).



Figura 3.Cacao Criollo
Fuente: Autor

2.2.3.3. Cacao Forastero.

El cacao Forastero es una variedad salvaje del cacao Criollo, fue encontrado en la región amazónica como Brasil, Guyana e incluso Venezuela, y se caracteriza por poseer frutos pequeños con extremos redondeados. La cáscara es lisa, poco arrugada y suave, posee pequeños surcos en su superficie. Sus semillas son ligeramente pequeñas de un color morado, de forma triangular. A nivel agronómico es mucho más resistente y fuerte a ciertas enfermedades o plagas que el cacao Criollo, por lo que es ampliamente cultivado para la industria chocolatera. Sin embargo, carece del exquisito sabor del cacao criollo (24).



Figura 4.Cacao Forastero
Fuente: Autor

2.2.3.4. Cacao Trinitario.

El cacao Trinitario se produjo por la fertilización cruzada entre los árboles de variedad Forastero y Criollo en un lugar de la Isla de La Trinidad en el año de 1730. La planta de la variedad trinitario da como resultado una combinación casi perfecta ya que posee el sabor exquisito del tipo criollo con la fortaleza y resistencia del tipo forastero. Sus frutos son de cáscara gruesa poco rugosa, con surcos prominentes, de extremos redondeados. Lo más importante es que dentro de este grupo se encuentra la variedad de la Colección Castro Naranjal, conocida mundialmente como CCN-51 (25).



Figura 5.Cacao Trinitario

Fuente: Autor

2.2.3.5. Cacao CCN-51.

El cacao CCN-51 es un clon que se consiguió en el Ecuador en 1965, después de varias investigaciones realizadas por el agrónomo ambateño Homero Castro Zurita, quien logro obtener el denominado cacao clonado Colección Castro Naranjal, .al combinar material genético de las variedades Trinitario y Forastero amazónico mediante doble hibridación. Sus estudios dio como resultado una variedad de cacao de excelente calidad, productividad (elevadamente fructífero) y resistente a enfermedades.

Por esta razón, el 22 de junio del 2005 fue declarado como bien de alta productividad, mediante acuerdo ministerial, Con esta declaratoria, el Ministerio de Agricultura buscó brindar apoyo para fomentar la producción de este cacao, así como su comercialización y exportación Las almendras tienen un alto contenido de grasa, por lo que industrialmente se utilizan para extraer su manteca (25).

Según datos del Servicio de Información y Censo Agropecuario (SICA), la variedad que da origen a este cacao criollo se denomina nacional y botánicamente pertenece a los denominados forasteros amazónicos. Este grano es producido exclusivamente por Ecuador. Los sembríos cacaoteros están ubicados especialmente en las provincias de Los Ríos, El Oro y Manabí. Dentro de la riqueza productiva agrícola, el grano aporta con más de 6%, pues se mantiene como una de las principales exportaciones del Ecuador. En el mercado externo el país compite con la producción cacaotera de países como Camerún y Brasil.



Figura 6.Cacao CCN-51

Fuente: Autor

2.2.4. Proceso post cosecha del cacao.

Según Vásquez y colaboradores (2019), (6) indicaron que las frutas de cacao se cosechan después de presentar un índice de maduración adecuada. La principal característica es el cambio de color, cuando la mazorca está lista para la cosecha cambia de color verde o púrpura hacia el color amarillo, rojo o anaranjado, de acuerdo a la especie. Se requiere una tijera de podar especial para la cosecha, cuya finalidad es evitar que las mazorcas sean lastimadas al separarse del árbol.

Luego de la recolección, las mazorcas, son cortadas de forma transversal o longitudinal en la cáscara o vaina con un machete o cuchillo para así exponer los granos y la pulpa evitando el daño de las almendras. Una vez el grano de cacao es extraído, atraviesa una etapa de fermentación anaeróbica en cajas de madera, sacos o montones.

La fermentación de las almendras se realiza en cajas de madera de laurel, pechiche o chanu durante horas 96 horas para cacao Nacional y 144 horas para cacao CCN-51, con remociones cada 48 horas (26).

Durante la fermentación se inicia con la transformación del azúcar de la pulpa de los granos en alcohol a una temperatura de 40°C y un pH de 6,5 en el primer día, donde se pierde el mucílago que se encuentra adherido a la testa debido a las enzimas peptinólíticas producidas por las levaduras y bacterias acidophilus donde hidrolizan el mucílago y producen lixiviados que se drenan a través de agujeros en el fondo de las cajas; gracias a la remoción facilita el acceso del aire provocando entre el segundo y cuarto día la oxidación del alcohol hasta el ácido acético.

Al final de la fermentación, el pH desciende de 6,5 hasta aproximadamente 4,5 a una temperatura ideal de 28 a 30°C; provocando el hinchamiento de la almendra y el cambio de color lila pálido a marrón. De igual manera, el grano pierde humedad (hasta 55%) y está expuesto a un consorcio de microorganismos (bacterias ácidas lácticas, bacterias acéticas, levaduras y hongos filamentosos) que promueven varios cambios físicos y químicos en la almendra (26) (27)

Después del proceso de fermentación las almendras son sometidas a un proceso de secado, que se lo puede realizar de manera natural (sol) o artificial (máquinas de secado). El secado natural se lleva a cabo por un tiempo de 6 a 8 días hasta obtener una humedad del 7%. Si las condiciones no permiten un secado bajo el sol, puede realizarse en maquinarias, reduciendo la humedad entre un 6% a 8%.

Finalmente, los granos de cacao obtienen el sabor y aroma a chocolate, y toman un color marrón (café) típico del cacao fermentado y secado correctamente; pudiendo ser almacenados o ingresar directamente al proceso de industrialización donde se desecha la cascarilla de la almendra (26) (28).

2.2.4.1. Tostado.

El proceso de obtención los nibs (granos sin cáscara) se realizan siguiendo las operaciones que se muestran a continuación (29):

- 1) **Secado:** Después de la fermentación, las almendras tienen alrededor de 55% de humedad, debe reducirse al 6 - 8 %, que es la humedad en la cual se debe almacenar y comercializar. Durante ese tiempo, las almendras de cacao terminan los cambios para obtener el sabor y aroma a chocolate, también en ese momento cambian los colores, apareciendo el color marrón (café), típico del cacao fermentado y secado correctamente, puede secar al sol, como también en secadoras artificiales.
- 2) **Tostado:** Las almendras de cacao tienen que tostarse para facilitar la eliminación de la cascarilla; sin embargo, cuando el tostado de las almendras se realiza a temperaturas altas o bajas y los periodos de tiempo son cortos o demasiado prolongados, el desarrollo de los perfiles de sabor es afectado favorablemente o por el contrario sufrir distorsiones. Los “cacaos finos” requieren una torrefacción

menos fuerte que los “ordinarios”. Por lo general los granos de cacao son tostados desde 110 hasta 150° C durante 25 a 50 minutos.

- 3) **Descascarillado:** Como consecuencia del tostado, la cáscara que está adherida firmemente al grano en el cacao crudo se separa de este, facilitando la operación de descascarado. El cacao y las cáscaras triturados caen a una zaranda formada por tamices de diferentes calibres donde las cáscaras por su forma y menor peso específico son arrastradas por una corriente de aire, separándose de esta manera el nibs de la cáscara.

2.2.4.2. Calidad de los granos de cacao.

Las variedades de cacao CCN-51 y Nacional, deben cumplir los siguientes requisitos establecidos en la NTE INEN 0176 (INEN, 2006):

Tabla 2. Requisitos técnicos del cacao

Requisitos	CCN-51	Cacao Fino
100 granos pesan en g.	110-125	>130
Humedad máxima %	7	7
Granos fermentados (min.)	55	75
Violeta (máx.)	15	26
Moho	1	4
Totales (análisis sobre 100 granos)	100	100
Defectuoso (análisis 500 gramos) (máx.)	0	3

Fuente: NTE INEN 01756 (2006) (30)

2.2.5. Residuos de la cadena de beneficio del cacao.

2.2.5.1. Cáscara de la mazorca.

La cáscara, correspondiente a la parte no comestible del fruto y representa entre el 45% y 50% del peso total, siendo considerado como desperdicio en los procesos

agroindustriales, lo que significa que este subproducto se puede utilizar como fuente natural de antioxidante (31).

Generalmente el aprovechamiento de las cáscaras está orientado para alimentación de animales (pollos de engorde), fertilizante, biogás y biocombustible. En la industria años, esta materia prima ha sido reconocida como subproducto valioso de la producción de chocolate, debido a su actividad antioxidante (7) (32).

2.2.5.2. Placenta de cacao.

La placenta es el eje central de la mazorca a la cual se encuentran unidos los granos de cacao, tiene adherida la pulpa y una de las principales funciones es la de proveer los nutrientes a los granos, por esta razón adquieren similares características representa alrededor del 5% del peso total de la mazorca.

Esta placenta durante la cosecha o extracción de la semilla es desechada en las plantaciones de cacao en conjunto con las cáscaras con la finalidad de abonar la tierra (27). En la industria alimentaria se utiliza la placenta para la extracción de pectina, microencapsulación de compuestos bioactivos y elaboración de galletas (33).

2.2.5.3. Mucílago de cacao.

El lixiviado de cacao es una sustancia viscosa blanca que está adherida y rodea a los granos; es considerado un producto novedoso por ende es derramado en las plantaciones de cacao durante el proceso de fermentación; sin embargo, durante esta actividad la pulpa es removida e hidrolizada por microorganismos. Parte de este mucílago es necesario para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras, pero de 5 a 7% de la pulpa hidrolizada drena como exudado.

El exudado del cacao es un líquido rico en azúcares que se expulsa dentro del proceso de fermentación y tiene un sin número de enzimas (peptinolíticas), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala* y *Schizosaccharomyces pombe*) y bacterias (lácticas, acéticas) (6) (34) (35). El mucílago o pulpa de cacao, puede ser aplicado en variedades de productos por sus características nutritivas y sensoriales (36).

2.2.5.4. Cascarilla de cacao.

La cascarilla o cáscara del grano del cacao se obtiene al extraer la almendra, y esta biomasa residual generalmente se vende como mantillo (abono) agrícola. Se compone de una lignina celulósica, especialmente rica en fibra dietética 18 – 60% (6).

Vásquez *et al.*, 2019 (6) afirman que, la cascarilla de cacao es tradicionalmente en jardinería como materia prima en mantillo, debido a su larga descomposición actuando como una base de formación de humus.

La creciente demanda de productos naturales está impulsando la industria de alimentos para invertir la recuperación de subproductos para obtener fibra dietética, antioxidantes, saborizantes y conservantes a partir de este residuo.

Tabla 3. Composición proximal de los residuos de cacao

Parámetros	RESIDUOS DEL CACAO					
	Cáscara		Cascarilla		Mucílago	
	CCN-51	Nacional	CCN-51	Nacional	CCN-51	Nacional
Humedad (%)	6.72	6.53	7.80	7.31	9.27	9.48
Proteína	4.52	4.50	17.13	17.10	6.13	6.05
Grasa	2.40	2.50	2.22	2.18	2.11	2.13
Cenizas	8.92	9.01	7.33	7.93	8.46	8.31
Fibra cruda	33.26	33.78	21.38	21.41	0.41	0.43
Extracto Libre de N	44.18	43.68	44.14	44.68	73.62	73.44

Fuente: Batista *et al* (2019) (7)

En la Tabla 4 se detallan los residuos del cacao con sus respectivos componentes funcionales junto al método de extracción y el uso que se le pueda dar a cada uno.

Tabla 4. Residuos y componentes funcionales del cacao

Residuos	Cáscara de la mazorca	Placenta de cacao	Mucílago	Cascarilla
Uso alimentario	Alimentación de animales	Bebidas alcohólicas	Conservas	Infusiones
Uso industrial	Adsorbente		Obtención de Bacterias ácido lácticas	Abono
Subproducto	Pectina	Exudado de la placenta	pulpa (mucílago) de cacao	
Componentes funcionales	Catequina, proantocianidina c. oligoméricos	Antocianos		Ácido oleico, ácido linoleico y antioxidantes
Método de extracción	Desgranado	Deshidratación	Secado, molienda, pulverización	Tostado, descascarillado
Valor agregado			Productos de panadería, mermelada, jaleas, vinos, bebidas, etc.	

Fuente: Kusch (2015) (37)

2.2.6. Valorización de residuos.

El cacao es de gran importancia en las actividades agrícolas del Ecuador, siendo la tercera mayor exportación que genera fuentes de trabajo directas e indirectas. Es parte esencial de la cotidianidad de muchas comunidades. Los granos de cacao comercializados hoy en día son semillas de un pequeño arbusto de la especie *Theobroma cacao* L., de la familia Esterculiácea. Es el único de su especie con un valor comercial y se subdivide principalmente en dos grupos, Criollo y Forastero (35)

La mayor dificultad que se presenta cuando se busca trabajar en el desarrollo de nuevos productos o el aprovechamiento de subproductos industriales, es la falta de información sobre las características nutricionales y funcionales que poseen subproductos como la cascarilla de cacao (38). La cascarilla de cacao se caracteriza por ser un material fibroso, seco, crujiente, de color marrón y con un olor similar al del chocolate. Cuando es removida de las almendras puede contener de 2 a 3% de pulpa residual que no pudo separarse (39).

De acuerdo con varios estudios, la cascarilla de cacao puede valorizarse desde diferentes puntos de vista, en los cuales se han identificado altos contenidos de fibra, destacándose un alto porcentaje (60%) de fibra dietética total. Además, de compuestos bioactivos como los polifenoles.

2.2.6.1. Antioxidantes.

Los antioxidantes son de gran interés nutricional contribuyendo al mantenimiento de salud humana protegiendo al organismo del daño producido por agentes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental y sustancias químicas presentes en alimentos. Impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar interactúan más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, la acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de molécula, lípidos, proteínas, ADN, etc. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos (40).

2.2.6.2. Polifenoles.

Los polifenoles son compuestos que participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, síntesis proteicas, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, defensa ante los factores adversos del ambiente, además están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringente y dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal y la característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (41).

2.2.6.3. Flavonoides.

Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos (42). Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil benzo γ pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano.

2.2.7. Capacidad antioxidante.

Desde la perspectiva de salud humana, la actividad antioxidante de un alimento viene dada por la capacidad de sus compuestos fitoquímicos conocidos como antioxidantes para desactivar u oxidar los radicales libres. Estas moléculas son altamente reactivas, y las principales causantes de daños en el organismo a nivel celular, incrementando el riesgo al desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y algunas degenerativas como la aterosclerosis, cardiopatías, enfermedades neurológicas (43).

El consumo de productos con una alta capacidad antioxidante es beneficioso para la salud humana, por que protegen al organismo de los radicales libres y minimizan el daño. Su presencia en aquellos alimentos y bebidas ricas en polifenoles aporta características funcionales que, además de cumplir su misión nutricional, actúan como agente quimiopreventivo promoviendo efectos fisiológicos para retardar la propagación del cáncer.

2.2.8. Métodos de determinación de la capacidad antioxidante.

Entre los métodos desarrollados para medir la actividad anti radical son la actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la absorción total de radicales potenciales (TRAP), la fotoquimioluminiscencia (PCL) y el método de decoloración del radical 2,2, difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

2.2.8.1. Método ABTS.

El ensayo decoloración de cationes radicales o ABTS [2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] se basa en la inhibición de la absorbancia del catión radical ABTS⁺ por los antioxidantes, que muestra un pico de absorción a 415 nm y máximos de absorción secundaria a 660,734 y 820 nm dando un color verde azulado.

Cuando Trolox (análogo soluble en agua de vitamina E) se usa como estándar, el método se llama TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox) (44).

En presencia de Trolox (o de antioxidante donador de hidrógeno), el átomo de nitrógeno apaga el átomo de hidrógeno, produciendo la solución de decoloración. ABTS puede ser oxidado por persulfato de potasio o dióxido de manganeso, dando lugar al radical catión ABTS (40).

2.2.8.2. Método ORAC.

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) es un método que mide la inhibición antioxidante de los radicales peroxilo de oxidaciones inducidas y refleja la cadena radical clásica rompiendo la actividad antioxidante por transferencia de átomos de Hidrógeno. En el ensayo básico, los radicales peroxilo generados a partir de descomposición térmica de AAPH (2,2'-azobis-(hidrocloruro de 2-amidinopropano) en un tampón acuoso o radical hidroxilo reaccionan con una sonda fluorescente, un pro oxidable sustrato de proteína, para formar un producto no fluorescente, que puede cuantificarse fácilmente por fluorescencia (42).

2.2.8.3. Método FRAP.

La capacidad de reducción férrica del plasma/ poder antioxidante reductor férrico (FRAP), se basa en la capacidad de los fenólicos para reducir complejo de tripiridiltriazina férrica amarilla (Fe (III) – TPTZ (2, 4, 6 – tri (2 – piridil) – 1, 3, 5, - triazina)) a complejo ferroso azul (Fe (II) – TPTZ) por la acción de antioxidantes donadores de electrones. Los de color azul resultantes medidas espectrofotométricamente a 593 nm se toma como relacionado linealmente con la reducción total de la capacidad antioxidante donadores de electrones. La absorbancia se puede medir para probar la cantidad de hierro reducido y puede correlacionarse con la cantidad de antioxidantes (40).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

El proceso de análisis fisicoquímico y funcional de la cascarilla se realizó con la colaboración de diferentes instituciones, cuya localización se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Localización de trabajo experimental

INVESTIGACIÓN	LOCALIZACIÓN
Preparación de la muestra	<ul style="list-style-type: none">• Recolección, fermentación y secado: Asociación “La Cruz”, Mocache, Los Ríos.• Descascarillado y torrefacción: Laboratorio de Servicio de Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Pichilingue, Provincia de Los Ríos
Análisis fisicoquímico y antioxidantes	<ul style="list-style-type: none">• Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Mejía Pichincha

Fuente: Coronel Álvarez, 2021

3.2. Tipos de investigación.

3.2.1. Investigación exploratoria.

La investigación fue de tipo exploratoria, porque en la zona de estudio no se ha desarrollado investigaciones sobre la determinación de la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao; razón por la cual se utilizaron las variedades de cacao CCN-51 y Nacional, por su grado de productividad y por la resistencia a enfermedades.

3.2.2. Investigación experimental.

Con este tipo de investigación se evaluó la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao variedad CCN-51 y Nacional, mediante los métodos ABTS, FRAP y ORAC.

3.3. Métodos de la investigación.

3.3.1. Método inductivo-deductivo.

Para la ejecución del trabajo de investigación se aplicó el método inductivo-deductivo, puesto que para la obtención de los resultados se parte de un problema con la finalidad de hallar posibles soluciones, para la que se busca brindar la facilidad tecnológica adecuada para los análisis correspondientes.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

La fuente primaria utilizada fue el trabajo de campo que se realizó en la investigación, desde el proceso de preparación de las muestras de la cascarilla de cacao hasta la determinación de la capacidad antioxidante, según los métodos establecidos. Mientras, para la información presentada en el marco conceptual y referencial se tomó de diversas fuentes secundarias como: revistas científicas, páginas web, artículos científicos, sitios web, informes y tesis referentes al tema.

3.5. Diseño de la investigación.

En esta investigación se utilizó la prueba “t” de Student y correlación de Pearson con la finalidad de comparar el contenido de antioxidantes de la cascarilla de cacao mediante los métodos ABTS, FRAP y ORAC.

Las hipótesis del experimento fueron:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$ H_0 : No existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) sobre la actividad antioxidante en la cascarilla de cacao.
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ H_1 : Existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) sobre la actividad antioxidante en la cascarilla de cacao.

Para obtener resultados fiables, se cuantificó la actividad antioxidante con tres repeticiones para cada variedad de cascarilla de cacao. Estas determinaciones se realizaron a un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

La combinación de los tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao en el contenido de la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. *Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el contenido de actividad antioxidante.*

Réplicas	Cacao CCN-51 (V1)	Cacao Nacional (V2)
1	V1 _{r1}	V2 _{r1}
2	V1 _{r2}	V2 _{r2}
3	V1 _{r3}	V2 _{r3}

Elaborado por: Coronel Álvarez, 2021

3.5.1. Esquema del ANDEVA.

En Tabla la 7 se presenta 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 la actividad antioxidante de las muestras de la cascarilla en estudio.

Tabla 7. *Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el contenido de actividad antioxidante en cascarilla de cacao.*

Parámetros	Cascarilla de cacao	
	CCN-51	Nacional
Media	$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$	$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$
Varianza	$S^2 = \frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}$	$S^2 = \frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}$
Número de observaciones	n = 3	n = 3
Grados de libertad	GL= n-1	GL= n-1
Estadísticos t	$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{s_d / \sqrt{n}}$	$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{s_d / \sqrt{n}}$
P(T<=t) una cola	$-t_{\alpha,n} = t_{1-\alpha,n}$	$-t_{\alpha,n} = t_{1-\alpha,n}$
Valor crítico de t (una cola)	$(-t_{0,01,9}, \infty)$	$(-t_{0,01,9}, \infty)$
P(T<=t) dos colas	$(-t_{\alpha/2, n-1}, t_{\alpha/2, n-1})$	$(-t_{\alpha/2, n-1}, t_{\alpha/2, n-1})$
Valor crítico de t (dos colas)	$(-t_{0,01,9}, \infty)$	$(-t_{0,01,9}, \infty)$

Elaborado por: Coronel Álvarez, 2021

3.5.2. Análisis de correlación.

Para determinar los compuestos antioxidantes responsables de la capacidad antioxidantes responsables de las muestras de la cascarilla de cacao se aplicó la matriz de correlación de Pearson (Tabla 8), a través del coeficiente de correlación de Pearson se identificó el grado de correlación que existe entre los contenidos fenólicos que son la Epicatequina, Catequina, Cafeína y Teobromina con la capacidad antioxidante in vitro de las muestras estudiadas. Para esto se empleó, la información obtenida por Arreaga (2020) (45) referente al estudio de Identificación de perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario.

Tabla 8. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas.

Compuestos fenólicos	Actividad Antioxidantes		
	* ABTS ⁺ (x)	**FRAP (y)	***ORAC (z)
Epicatequina (w)	r_{wx}	r_{wy}	r_{wz}
Catequina (x)	r_{xx}	r_{xy}	r_{xz}
Cafeína (y)	r_{yx}	r_{yy}	r_{yz}
Teobromina (z)	r_{zx}	r_{zy}	r_{zz}

*ABTS (actividad antioxidante por el método del radical catiónico)

**FRAP (capacidad de reducción férrica del poder antioxidante reductor férrico)

***ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

Elaborado por: Coronel Álvarez, 2021

3.6. Instrumentos de la investigación.

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 obtuvo los residuos empleados como material de estudio (cascarilla de cacao). Las unidades experimentales estuvieron constituidas de 45 kg de cacao en baba de cada variedad.

3.6.2. Fermentación.

El proceso pos-cosecha 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.

Las almendras fermentadas se secaron al sol durante 7 días hasta obtener una humedad aproximada de 7%. Luego de esto, el grano se llevó a un tostador de placas, donde se realizó la torrefacción de las almendras durante 45 min. Las muestras de cascarilla de cada variedad de cacao se obtuvieron con ayuda de un descascarillador mecánico (10 a 20 min).

Tanto la fase de tostado como el de descascarillado se realizaron en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue.

3.6.3. Preparación de la muestra.

Para las determinaciones analíticas, las muestras de cascarilla de cacao fueron molidas y almacenadas en recipientes herméticos; aislados de la luz, humedad y oxígeno, para su posterior caracterización funcional.

3.6.4. Actividad antioxidante

3.6.4.1. Extracción.

Para la extracción de los componentes fenólicos se pesaron 0,3 g de cascarilla añadiendo 5 mL de una disolución de metanol, agua, ácido fórmico (70:30:0,1 %; v/v/v). El proceso de extracción se realizó durante cinco ciclos combinados de agitación (agitador-incubador VWR, USA) e inmersión en un baño de ultrasonidos (baño de ultrasonido Selecta; Barcelona, USA) durante 5 y 10 minutos, respectivamente. Posteriormente la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 4400 rpm (centrífuga Hermle Z320; Alemania). El extracto bruto de cada ciclo de extracción se recolectó en un matraz volumétrico y se enrasó a 25 mL con la disolución extractora (46).

La disolución obtenida se empleó para la cuantificación de la capacidad antioxidante por los tres métodos propuestos (47).

3.6.4.2. Validación de los métodos

Para la determinación de la capacidad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC se realizará la validación de los métodos experimentales en base a los siguientes criterios:

a) 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 13 curvas de calibración de Trolox durante 3 días en intervalos de 0 a 800 $\mu\text{M Trolox}\cdot\text{L}^{-1}$ en ABTS, de 0 a 500 $\mu\text{M Trolox}\cdot\text{L}^{-1}$ en FRAP, y de 0 a 700 $\mu\text{M Trolox}\cdot\text{L}^{-1}$ en ORAC. A partir de los valores de concentración definidos (X) y del promedio de las lecturas 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 determinaron parámetros como la pendiente (m), el coeficiente de correlación (R^2) y el intercepto (a). Para las concentraciones medidas ($\mu\text{M Trolox}\cdot\text{L}^{-1}$) se estableció como criterio de aceptación cualitativo un $r^2 \geq 0,99$; mientras que la validación estadística del modelo lineal se realizó mediante la prueba t-Student ($p < 0.05$) (47).

b) Límites de detección y cuantificación.

Para la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizaron seis mediciones del blanco o testigo reactivo (compuesto por todos los reactivos menos la muestra), de acuerdo con las recomendaciones establecidas en la guía técnica de validación de métodos. A partir de estas mediciones se establecieron el promedio y la desviación estándar (DS).

Para el cálculo del LD se estableció la absorbancia promedio del blanco más tres DS (blanco+3DS). En el caso del límite de cuantificación se expresó como la absorbancia promedio del blanco más diez DS (blanco+10DS). El LD y el LC constituyeron la cantidad mínima que puede detectar y cuantificar el método con exactitud y precisión (47).

c) Exactitud.

La exactitud se evaluará como porcentaje de recuperación de los analitos en estudio. Para esto se determinó el número de ciclos de extracción necesarios para obtener el 100% de los antioxidantes de las tres frutas siguiendo la metodología establecida para el estudio (46).

d) Precisión.

La precisión del método se evaluó mediante un ensayo de repetitividad, para esto se analizó una muestra y 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 (47).

Con los resultados se verificó que el método tenga la precisión adecuada para el nivel de concentración medida ($\mu\text{M Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$) utilizando la ecuación de Horwitz (CVHorwitz). Este parámetro es utilizado para la validación de ensayos interlaboratorios, y se relaciona el CV en función de la concentración del analito, como se muestra en la Figura 7, también conocida como trompeta de Horwitz

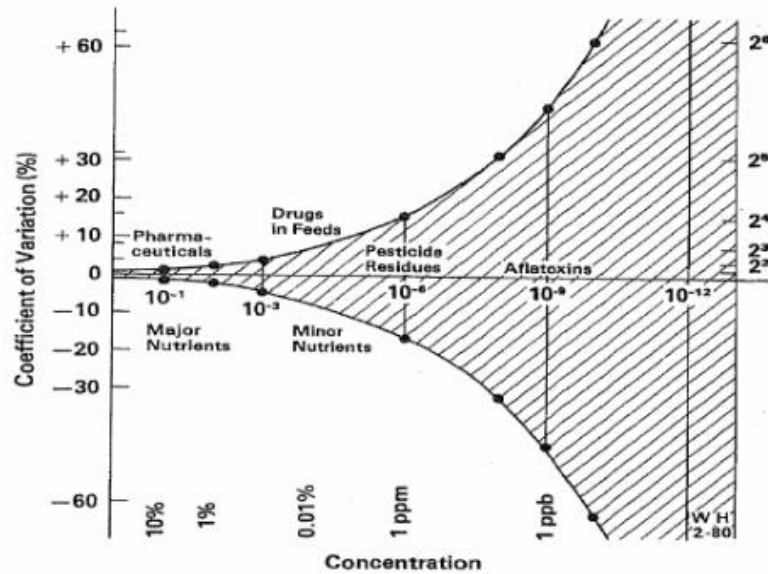


Figura 7. Ecuación de Horwitz
Fuente: Sandoval (2010) (47)

3.6.4.3. Cuantificación.

a) Método del ABTS

La capacidad antioxidante de las dos variedades de cacao propuestas (Nacional y CCN-51), se determinó por el método del ABTS de acuerdo al proceso descrito por Re *et al.* (48), con algunas modificaciones. La cuantificación se efectuó por espectrofotometría UV-VIS a 734 nm, utilizando una curva estándar Trolox ($0-800 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados se expresaron como μM de Trolox equivalente ($\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$) de muestra seca.

b) Método del FRAP

La capacidad antioxidante por FRAP se determinó siguiendo el método propuesto por Benzie y Straint (1996) (49). Para la cuantificación de este parámetro se realizó una reacción colorimétrica y se midió a 700 nm empleando espectrofotometría UV-VIS, frente a una curva estándar de Trolox ($0-700 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados se reportan como mM Trolox equivalentes ($\text{TE}\cdot\text{g}^{-1}$) de muestra seca.

3.6.4.4. Actividad antioxidante ORAC.

La capacidad captadora de radicales de oxígeno de los antioxidantes del mucílago de cacao se midió por el método ORAC, a través de su capacidad de captación del radicales peroxilo, por la transferencia de átomos de H^+ . El cálculo de estos valores se realizó a

partir de las áreas netas integradas bajo la curva de decaimiento de la reacción; tomando en cuenta el tiempo de demora, la tasa inicial y el grado total de inhibición en un solo valor (50).

3.7. Recursos humanos y materiales.

3.7.1. Recursos humanos.

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

- Ing. Wilma Llerena Silva M. Sc., 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.

3.7.2. Materiales.

3.7.2.1. Materia prima.

- Cascarilla de cacao Nacional
- Cascarilla de cacao CCN-51

3.7.2.2. 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 centrifuga de 15 y 50 mL
- Espátula
- Agitadores magnéticos
- Termómetro
- Micropipetas 100-1000 μ L y 1-10 mL
- 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 μ l
- Puntas de micropipeta 100-1000 μ l
- Puntas de micropipeta de 1-10 ml
- Tubos Eppendorf
- Guantes de nitrilo pack/50
- Mascarillas
- Frascos plásticos de 250 ml, para muestras

3.7.2.3. 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

3.7.2.4. Equipos.

- Brixómetro
- Congelador
- Balanza analítica
- Estufa de secado
- Baño ultrasónico
- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Mezclador de gases
- Vortex
- Rotoevaporador
- Multimixer
- Reflectómetro
- Espectrofotómetro UV-VIS
- pH-metro
- Placa agitadora
- Baño María
- Cronómetro
- Micropipeta Finnpipette 20-200 μ l
- Micropipeta Finnpipette 100-1000 μ L
- Micropipeta Labnet de 1-10 ml
- Micropipeta Finnpipette de 1-10 ml
- Micropipetas 100-1000 μ L y 1-10 mL
- Refractómetro 0 a 30 °Brix

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Validación de los métodos.

4.1.1. Linealidad.

Como parte de la validación del método, se realizaron las curvas de calibración de Trolox para validar los métodos de actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC ejecutados durante 3 días a intervalos de 0 a 100 ppm. El análisis estadístico de linealidad se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración Trolox para la validación de los métodos de actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC

MUESTRA	PROMEDIO		
	ABTS ⁺	FRAP	ORAC
Pendiente (m)	0.0013	0.0016	0,4167
ordenada al origen (Lo)	0.1260	0.1018	15,8163
Desviación estándar de la pendiente	0.0000	0.0001	0.0110
Desviación estándar de la ordenada	0.0202	0.0229	0.2173
Error típico (Sy,x)	0.0267	0.0285	0.2530
Coefficiente de determinación (R^2)	0.998	0.998	0.998
T _{student} calculado	30.183	29.217	38.34
T _{student} tabla	2.45	2.57	2.78
m (mínimo)	0.0012	0.0015	0.3816
m (máximo)	0.0015	0.0018	0.4518
Lo (mínimo)	0.0741	0.0383	15.1248
Lo (máximo)	0.1779	0.1653	16.5078

Elaborado por: Coronel Álvarez, 2021

Los resultados presentados en la Tabla 9, indican que las curvas estándar de Trolox desarrolladas para validar los métodos de actividad antioxidante de ABTS, FRAP y ORAC mostraron coeficientes de determinación (R^2) de 0.998, lo que indica una fuerte correlación entre la concentración de los estándares (X) y la absorbancia (Y) ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$). Por lo tanto, el 99.8% de la variabilidad de los datos experimentales podría explicarse por los modelos de regresión obtenidos, que mostraron un adecuado ajuste lineal ($R^2 \geq 0,99$) en todos los casos.

La Figura 8 muestra las curvas de calibración promedio utilizadas para cuantificar el nivel de capacidad antioxidante de las muestras analizadas.

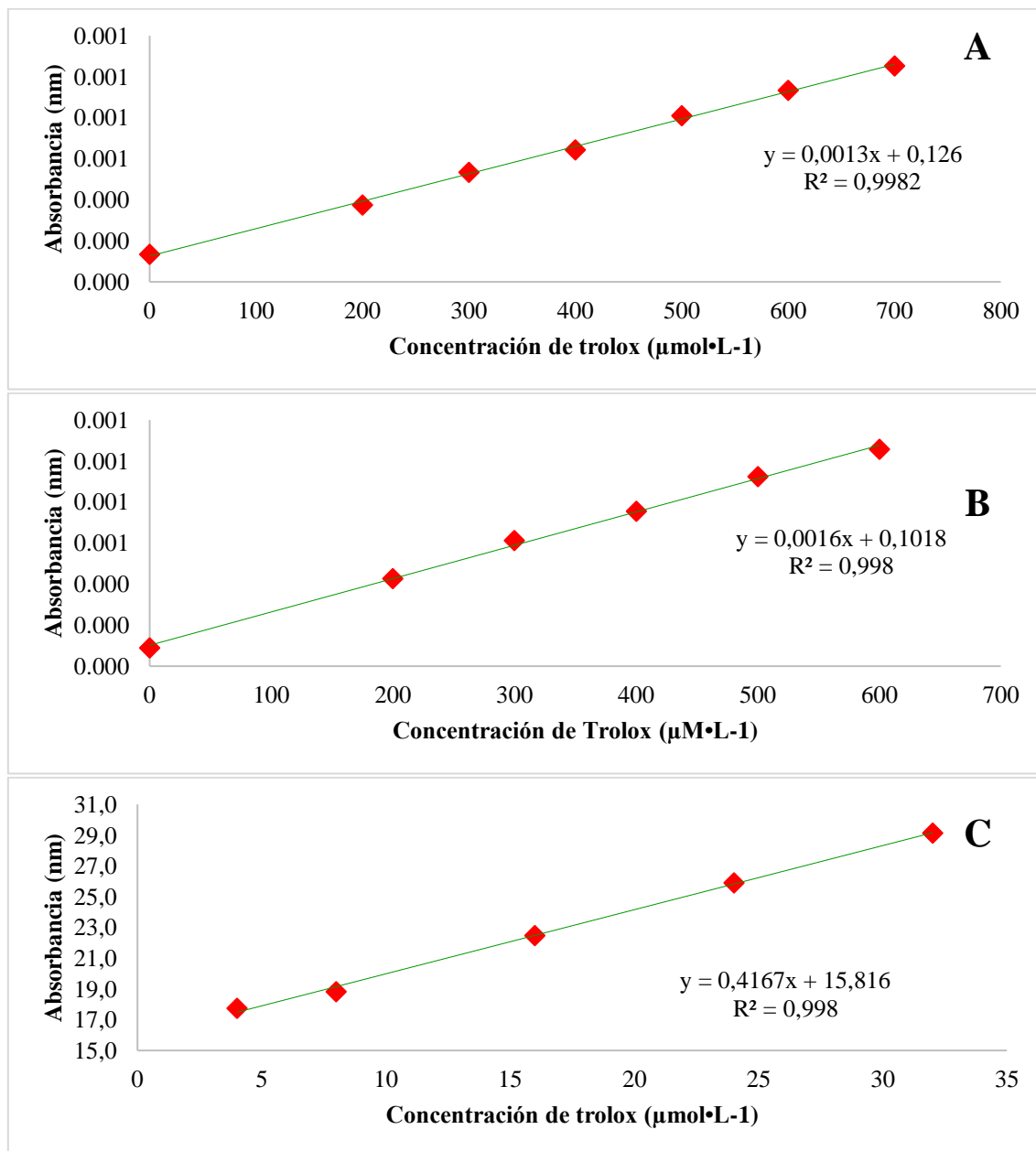


Figura 8. Curvas de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C)

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 8, las curvas de calibración estándar de Trolox desarrolladas para validar los métodos de actividad antioxidante de ABTS, FRAP y ORAC, 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 por absorbancia (ABTS y FRAP) y fluorescencia (ORAC) con la concentración, comprobándose que el equipo y los analistas proporcionan resultados confiables.

4.1.2. Límites de detección y cuantificación.

Con la finalidad de determinar la concentración mínima de analito que puede detectar el equipo utilizado se estudiaron parámetros como el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Como se puede observar en la Tabla 10, los valores de estos límites 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. En el método ABTS, la absorbancia mínima que debe admitirse para que un valor sea considerado dentro de LC y LD son 0.257 y 0.192, respectivamente. En FRAP las absorbancias fueron LC 0.141 y LD 0.114. Para el método de ORAC los valores fueron 20.628 para el LC y 17.970 para LD.

Tabla 10. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de la actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC.

Parámetro	Método		
	ABTS	FRAP	ORAC
Promedio	0.127	0.088	15.313
Desviación estándar	0.022	0.009	0.886
Límite de cuantificación (LC)	0.257	0.141	20.628
Límite de detección (LD)	0.192	0.114	17.970
LC ($\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$)	8.1600	2.0192	0.9623
LD ($\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$)	4.1080	0.6446	0.4308

Elaborado por: Coronel Álvarez, 2020

Para los métodos de ABTS⁺ y FRAP propuestos se obtuvieron un Límite de cuantificación (LC) de 8.1600 y 2.0192 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, siendo superiores a lo obtenido en el método ORAC, con un valor de 0.9623 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$; sin embargo, los valores anteriores representan la mínima cantidad que puede ser determinada cuantitativamente sin que el CV (%) ni el porcentaje de error sean mayores al 16%, como indica la trompeta de Horwitz para concentraciones $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ o ppm. Por lo tanto en el Límite de detección (LD) instrumental se obtuvo concentración de 4.1080 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ en el método ABTS, siendo este valor superior a lo registrado por los métodos FRAP y ORAC con 0.6446 y 0.4308 $\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente.

Los presentes valores obtenidos en el límite de detección corresponden a la cantidad mínima de analito que da una respuesta significativamente diferente al blanco o al ruido de una disolución que no contiene dicho analito.

4.1.3. Exactitud.

Durante la validación de las metodologías analíticas, se determinó el número de ciclos necesarios para recuperar el 100% de los antioxidantes presentes en cada muestra de cascarilla, al emplear una disolución metanólica (metanol/agua/ácido fórmico; 70/30/0.1 %; v/v/v).

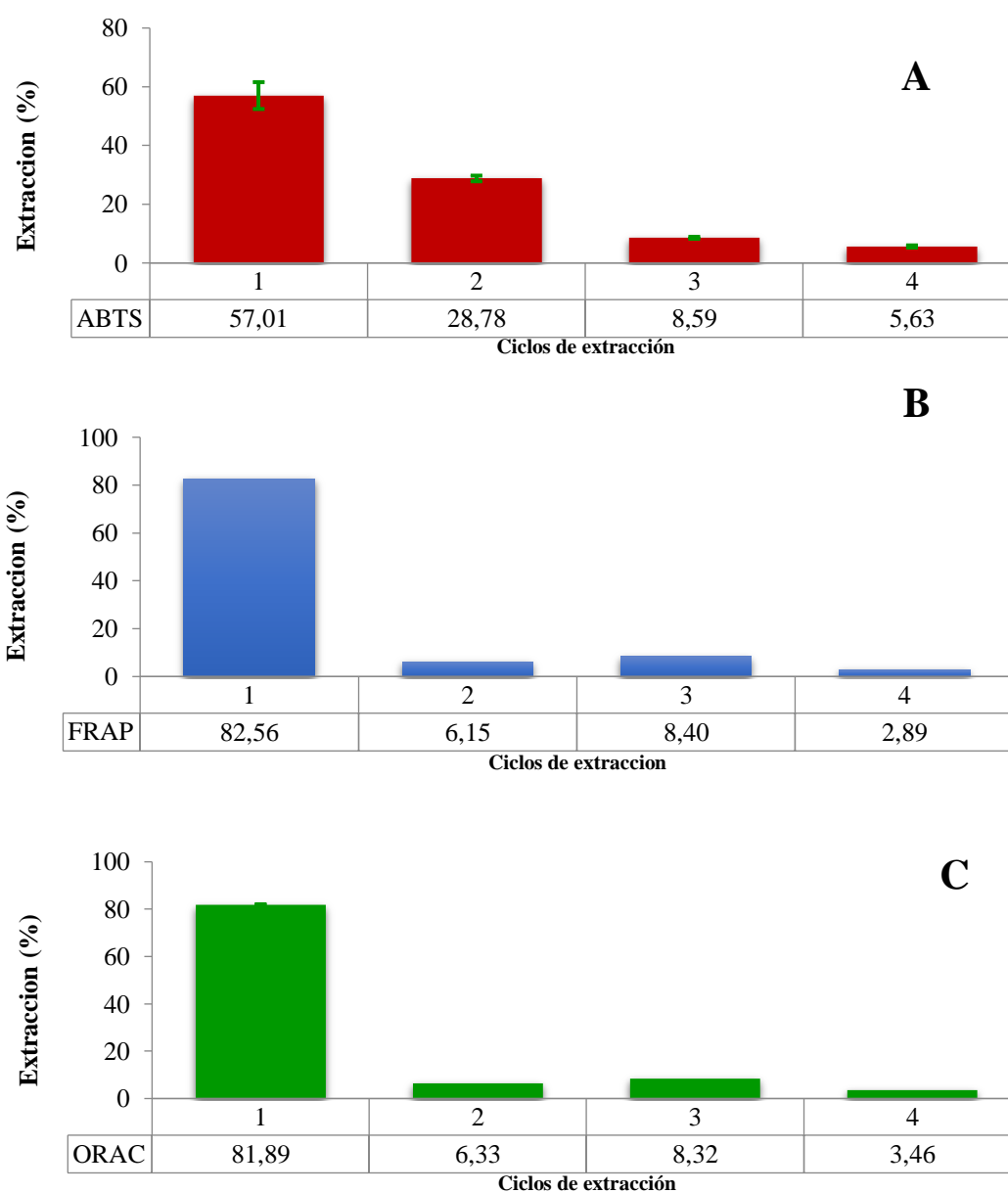


Figura 9. Porcentaje de extracción para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C)

Según los resultados presentados en la Figura 9, se necesitan al menos cuatro ciclos combinados agitación e inmersión en un baño de ultrasonidos durante 5 y 10 minutos, respectivamente.

Los porcentajes de extracción obtenidos tras el primer ciclo de recuperación fueron de 57.01% para ABTS, 82.56% para FRAP y 81.89% en ORAC. Los porcentajes altos de recuperación de este proceso de extracción se deben al hecho de que medios alcohólicos acidificados (metanol/ácido fórmico) favorecen a la recuperación de los antioxidantes hidrófilos predominantes (polifenoles, flavonoides) en la cáscara del cacao.

En la investigación realizada Martínez (51) se manejaron distintas soluciones de extracción (etanol y metanol: acetona 50:50 v/v,); donde la cascarilla de cacao obtuvo una menor actividad antioxidante en la extracción etanólica (50:50 v/v) y una actividad antioxidante superior cuando se realizó la extracción con metanol y acetona. La diferencia en los resultados obtenidos puede atribuirse a varios factores como el tipo de disolventes empleados en el proceso de extracción y la zona geográfica de procedencia de la muestra.

Según el trabajo de revisión realizado por Singh y Singh (2010) (52) existen métodos para la determinación de capacidad antioxidante, en los que la fuente de radicales es soluble únicamente en disolventes orgánicos y la interferencia de absorbancia de los compuestos podría ser un problema para el análisis cuantitativo.

Puesto que la absorbancia de la muestra puede disminuir al cambiar el tipo de solvente (metanol y acetona). Además manifiestan que, su aplicación puede limitarse al tipo de matriz empleada como material de estudio, puesto que, en muestras proteicas puede provocar la precipitación del plasma en el medio alcohólico

4.1.4. Precisión.

Después del proceso de extracción, se realizaron ensayos de precisión de las técnicas espectrofotométricas en base a la repetitividad del método, la misma que se estableció midiendo el contenido de actividad antioxidante por método ABTS, FRAP y ORAC, en una muestra con cuatro réplicas como se detalla en la Figura 10.

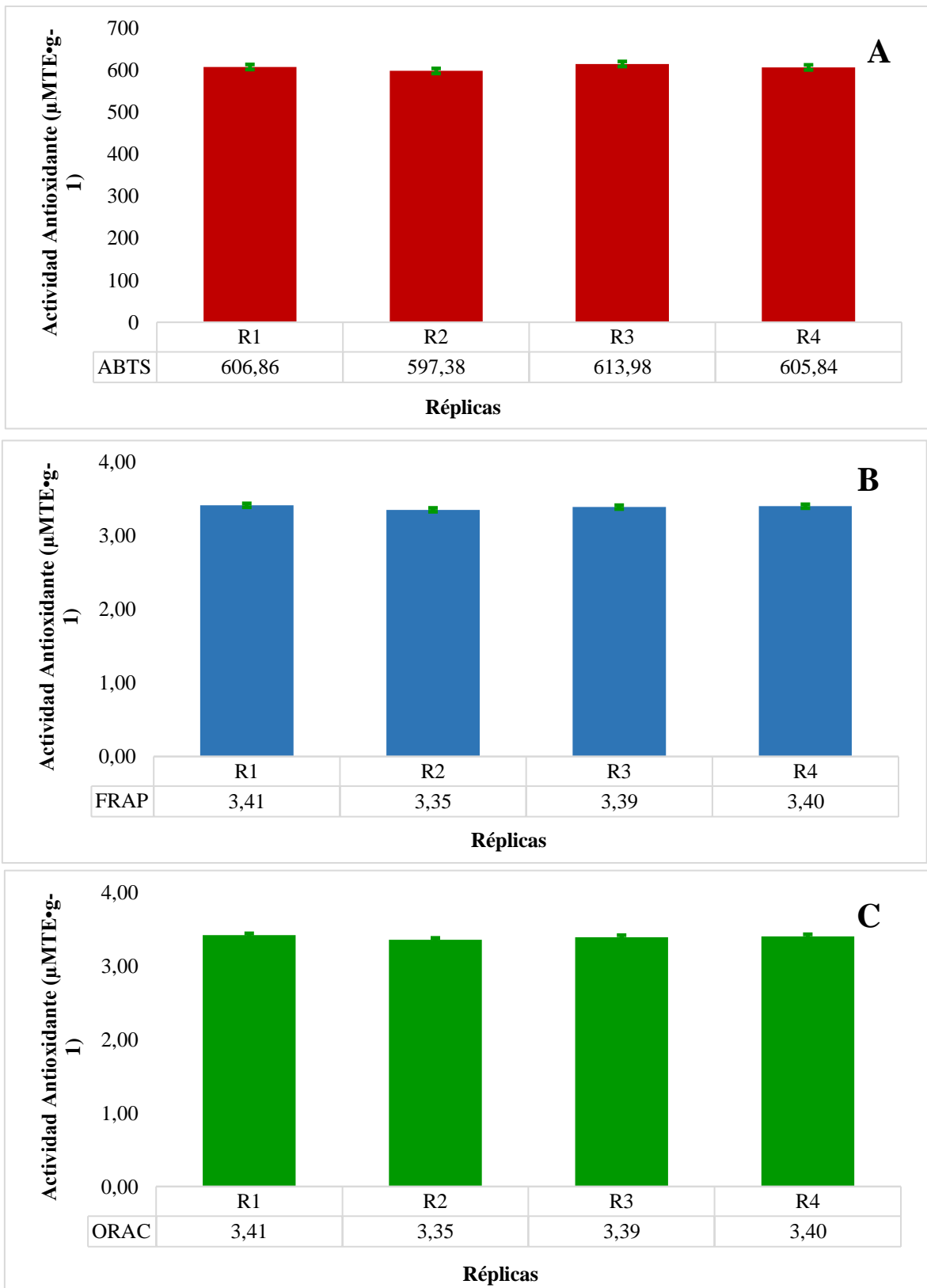


Figura 10. Repetitividad del método para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C)

En la Figura 10 se aprecia que los métodos presentan una desviación estándar (D.E.) de 6.04 y coeficiente de variación (C.V.) de 1.0%; continuando con el método FRAP que registra D.E. de 26.59 y C.V. de 0.78%, y finalmente en ORAC los valores son D.E. 3.23 y C.V. de 1.25%. Por lo anterior, dichos resultados de CV son menores a la información de referencia de la trompeta de Horwitz (Figura 7) con un nivel de concentración máximo del 16 %; indicando que los métodos son precisos y por ende las mediciones resultaron confiables.

4.2. Capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante se utiliza ampliamente como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales (frutas, verduras, vinos, té, aceites, etc.). Esta actividad está relacionada con compuestos capaces de proteger un sistema biológico frente al efecto potencialmente dañino de procesos o reacciones que provocan una oxidación excesiva, involucrando especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (RONS) (53).

Para su determinación, se utilizan varios métodos para medir la actividad antioxidante de un material biológico. Los métodos más utilizados por su facilidad, rapidez y sensibilidad son los que involucran compuestos cromógenos de naturaleza radical para simular EROS y RONS

4.2.1. Determinación de la capacidad antioxidante

Después de la validación de los métodos, se procedió a la determinación de la actividad antioxidante empleando los métodos de ABTS, FRAP y ORAC en cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional como se muestra en la Figura 11.

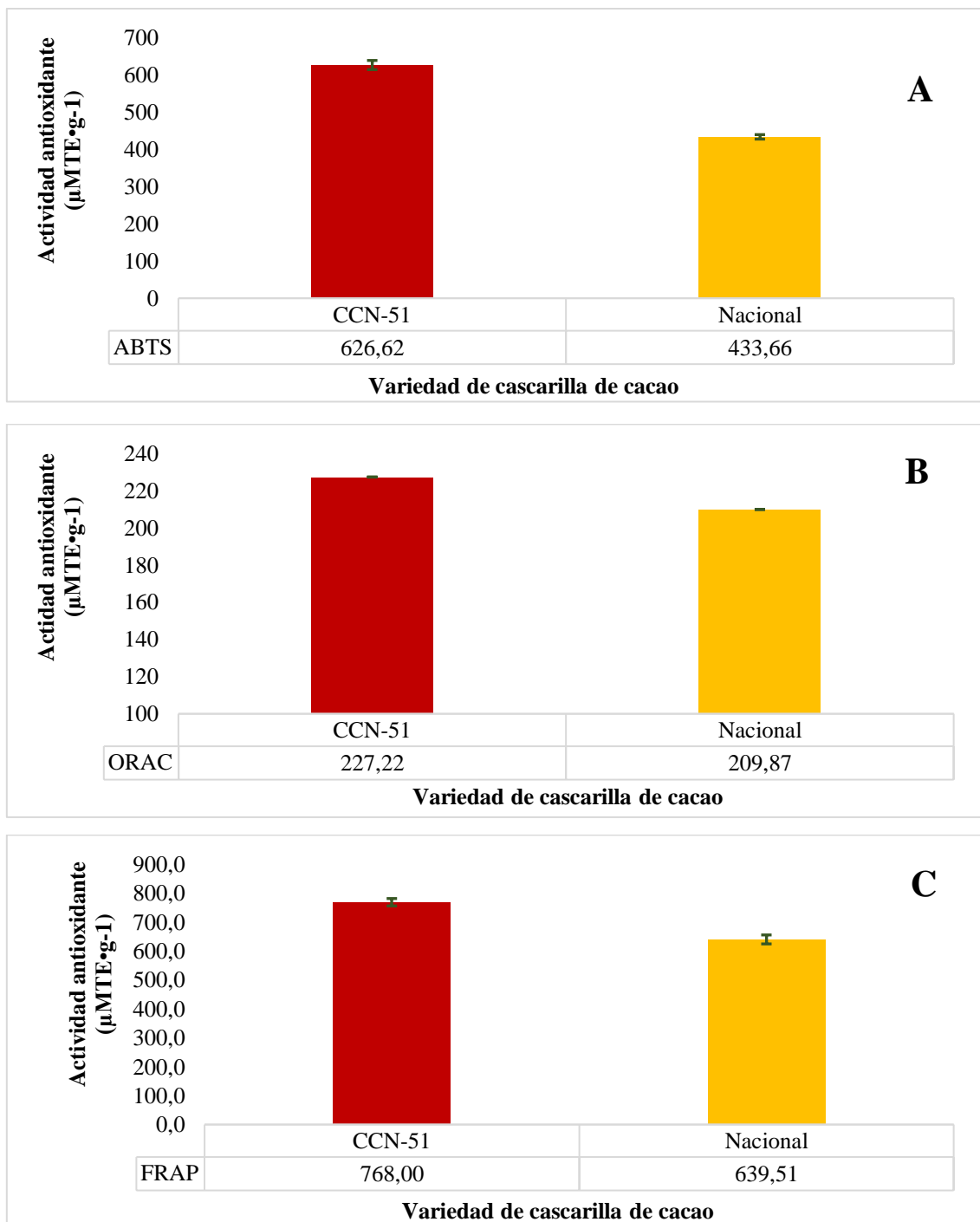


Figura 11. Capacidad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C) en la cascarilla de Cacao CCN-51 y Nacional

En base a los resultados obtenidos, se observa que los valores de la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao de la variedad CCN-51 medidas por los métodos FRAP (768.00 $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$) y ORAC (626.62 $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$) son superiores a los obtenidos por el método ORAC, cuyo resultado fue de 227.22 $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$. Mientras en la cascarilla de la variedad Nacional, los valores obtenidos fueron de 433.66, 639.51 y 209.87 $\mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$ en los métodos ABTS, FRAP y ORAC, respectivamente.

Los resultados demuestran que el contenido de los compuestos antioxidantes no es igual en las dos variedades de cascarilla de cacao, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las dos muestras de cascarilla; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0); de esta manera se evidencia que existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en la actividad antioxidante en la cascarilla de cacao. La actividad antioxidante en el método ABTS obtuvo un valor de $t_{\text{calculado}}$ (6.1796) superior al valor de $t_{\text{crítico}}$ (2.92). De igual manera los resultados obtenidos por los métodos FRAP ($t_{\text{calculado}} = 82.1885$) y ORAC ($t_{\text{calculado}} = 20.0543$), demostraron que existe diferencias estadísticamente significativas ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$) entre las dos variedades de mucílago. La prueba t de Student, confirmó que las muestras de mucílago de la variedad CCN.51 presentan mayor cantidad de compuestos antioxidantes en los métodos de ABTS, FRAP y ORAC con un valor $t_{\text{calculado}}$ superior a $t_{\text{crítico}}$.

Vivanco *et al* (2017) (54) señalan que la actividad antioxidante contra el radical DPPH de la cáscara del cacao fue levemente menor en la variedad CCN-51 que en la variedad Nacional. La mazorca de cacao contiene una cantidad significativa de compuestos fenólicos

Existe muy poca información referente a la determinación de actividad antioxidante en residuos, co-productos o subproductos de la cadena de beneficio del cacao. Los pocos estudios encontrados presentan valores que difieren de este trabajo de investigación o utilizan otros métodos para la determinación de capacidad antioxidante.

En el estudio de Martínez *et al* (2012) (51), se evaluaron diversas propiedades antioxidantes; en la cascarilla de cacao de dos lugares de procedencia (Cone y Taura) reportaron valores de 4.45 y 4.56 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ para actividad antioxidante medida por ABTS y 1.51 y 1.78 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ para el método FRAP. La extracción de metabolitos antioxidantes se realizó empleando metanol: acetona, como disolventes para muestras procedentes de Cono y Taura (Guayas, Ecuador). Ordoñez *et al* (55) por su parte, reportaron valores de 4,22 $\text{mg TE}\cdot\text{g}^{-1}$ (16.86 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$) para la capacidad antioxidante medida por el método ABTS, para muestras de cascarilla de cacao comercial procedente de planta de procesamiento de la cooperativa Agroindustrial Naranjillo (Huánuco, Perú).

Los valores obtenidos por Martínez y Ordoñez son inferiores a los reportados en esta investigación. La variación de los resultados obtenidos en este estudio frente al trabajo

desarrollado por otros autores, puede deberse a varios factores como los tipos de disolventes empleados en el proceso de extracción y la zona geográfica de procedencia de la muestra. De acuerdo con los estudios realizados por Arnao (2000) (53), Guevara *et al* (2019) (56) y Mazzuti *et al.* (2018) (57), la recuperación de componentes antioxidantes como los polifenoles y otros fitoquímicos de los materiales vegetales se ven influenciadas por la solubilidad de estos compuestos bioactivos en el solvente utilizado y la polaridad del disolvente, que jugará un papel clave en el aumento de la solubilidad fenólica.

De acuerdo con el trabajo de Martínez 2012 (51), el uso de diferentes solventes como etanol y metanol; acetona pueden generar una variación de los resultados. Este autor demostró que los extractos etanólicos (2,48 y 2,56 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$) presentan una menor actividad antioxidante que los extractos metanol:acetona (4,10-4,17 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$). Es así que, se pueden utilizar varios métodos para la extracción de compuestos bioactivos, dependiendo de las sustancias de destino. Sin embargo, un proceso de validación de los procesos de extracción puede garantizar la obtención del 100% de los compuestos antioxidantes de interés. Por lo que, el uso de técnicas de extracción consecutiva como la propuesta en este trabajo de investigación (agitación, baño de ultrasonidos y centrifugación) permiten recuperar diferentes componentes responsables de la actividad antioxidante de la muestra.

Según, investigaciones realizadas por Samaniego *et al* (2020) (58), existe un efecto de la zona de producción (Costa y Amazonía) sobre el contenido de compuestos antioxidantes de muestras de cacao de diferentes regiones y cantones del Ecuador. De acuerdo con esta investigación, el contenido antioxidante de la provincia del Guayas es significativamente diferente a la provincia de Los Ríos, confirmando los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

En otros trabajos de investigación publicados por distintos autores, la actividad antioxidante también varía entre muestras al emplear otros métodos para la determinación de este parámetro. Abdul *et al* (2014) (59) reportaron valores de 1.87 $\text{gFeT}\cdot\text{g}^{-1}$ (33.60 $\text{mol Fe}\cdot\text{g}^{-1}$) en cascarillas de cacao procedentes de una mezcla de clones procedentes de la colección del Centro de Investigación y desarrollo de Cacao en Malasia. Awarikabey *et al.* (60), afirman que el proceso de tostado afecta a la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao presentando valores de 55.26 $\text{mg ácido ascórbico equivalente}\cdot\text{g}^{-1}$

(313,76 $\mu\text{M AAE}\cdot\text{g}^{-1}$) en muestras sin tostar y disminuye a 45.58 mg $\text{AAE}\cdot\text{g}^{-1}$ (258.80 $\mu\text{M AAE}\cdot\text{g}^{-1}$) en muestras de cascarilla de cacao tostado y fermentado.

Al comparar la actividad biológica de los residuos de cacao, Martínez *et al.*, (2012) (51) demostraron que en las mazorcas de cacao presentan valores de 24.13 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ (de la muestra proveniente de Cone) y 23.03 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ (muestra de Taura) medidas por los métodos ABTS y FRAP; respectivamente. Con valores de inferiores en la cascarilla de cacao de 2.56 y 0.67 en el método de ABTS y 2.89, y 0.74 en FRAP para muestras de Cono y Taura (Guayas, Ecuador).

A nivel general, la actividad antioxidante de los residuos o subproductos de la cadena de cacao son inferiores a la capacidad antioxidante de las almendras presentando valores de 55,65 y 63,951 $\mu\text{mol TE}\cdot 100\text{g}^{-1}$ medidas por el método de ORAC en muestras de cacao colombiano. En el mucílago de cacao, Zhunio (2020) (60) reportó valores de actividad antioxidante de 8.54, 7.89 y 1,33 $\mu\text{M TE}\cdot\text{mL}^{-1}$ en muestras de la variedad Nacional x Trinitario; medido por los métodos de ABTS, FRAP y ORAC. Mientras que, en cascarilla de cacao CCN-51 los valores fueron de 3.40, 3.35 y 1,28 $\mu\text{M TE}\cdot\text{mL}^{-1}$ por el método de ABTS, FRAP y ORAC; en ese orden.

Es muy difícil evaluar la actividad antioxidante de una matriz alimentaria, basándose en un solo método; puesto que, este solo proporcionará información básica sobre las propiedades antioxidantes. Por lo general, los métodos *in vitro* miden la capacidad de los antioxidantes, en un material vegetal como la cascarilla de cacao para eliminar radicales específicos, al inhibir la peroxidación de lípidos o quelar los iones metálicos (Martínez). En este estudio, se han utilizado tres métodos diferentes para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de coproductos de cacao: ABTS, FRAP y ORAC.

La actividad antioxidante de los coproductos del cacao podría atribuirse a los compuestos fitoquímicos que contienen y especialmente, a los compuestos polifenólicos principalmente compuestos flavan-3-ol como los monómeros catequina y epicatequina, y el dímero procianidina B₂. Según el trabajo de investigación realizado por Arreaga (2020), la cascarilla de cacao es rica en compuestos fenólicos como Catequina y Epicatequina y metilxantinas como Teobromina y Cafeína.

Comparando con los resultados de Arreaga (2020) (45), dentro de la cuantificación del perfil de compuestos fenólicos se observó que las muestras de cascarilla de cacao solo

presentan Catequina (CAT) y Epicatequina (EPI) en las dos variedades de cacao; encontrándose un efecto de la variedad en el contenido de CAT; siendo mayor en Nacional (16,16 mg•L⁻¹) que en CCN-51 (4,99 mg•L⁻¹) (Figura 12). La ausencia de Procianidinas en la cascarilla de cacao se debe a que estos compuestos se pierden en estado de fermentación (60%), secado y tostado del grano.

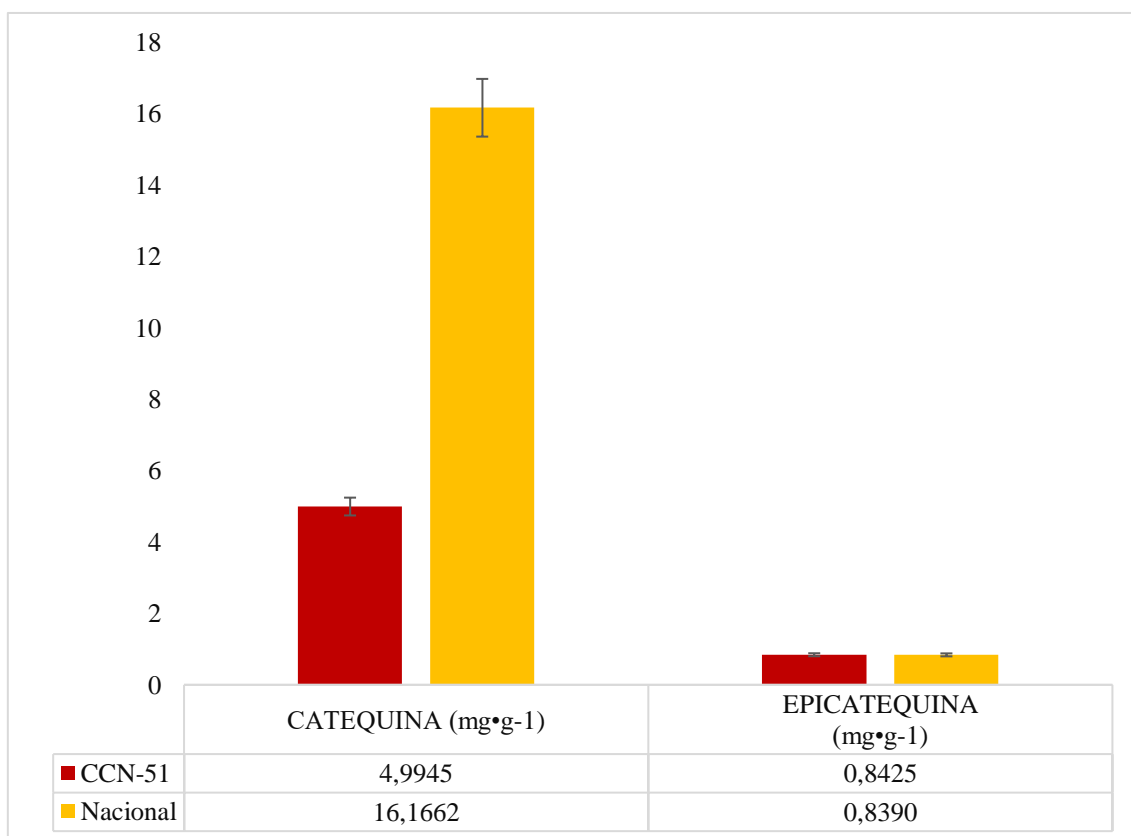


Figura 12. Compuestos fenólicos de la cascarilla de dos variedades de cacao, Arreaga (2020)

En cuanto al contenido de metilxantinas, la variedad Nacional presentó los mayores contenidos de Cafeína (0,35%) y de Teobromina (1,28%), en relación al contenido de metilxantinas de la cascarilla de la variedad CCN-51 (CAF= 0,11% y TBR= 0,92%) (Figura 13). El análisis estadístico de los resultados, demostrándose que existe un efecto de la variedad de cacao sobre el contenido de Teobromina y Cafeína de las cascarillas de cacao ($p < 0,05$) (45).

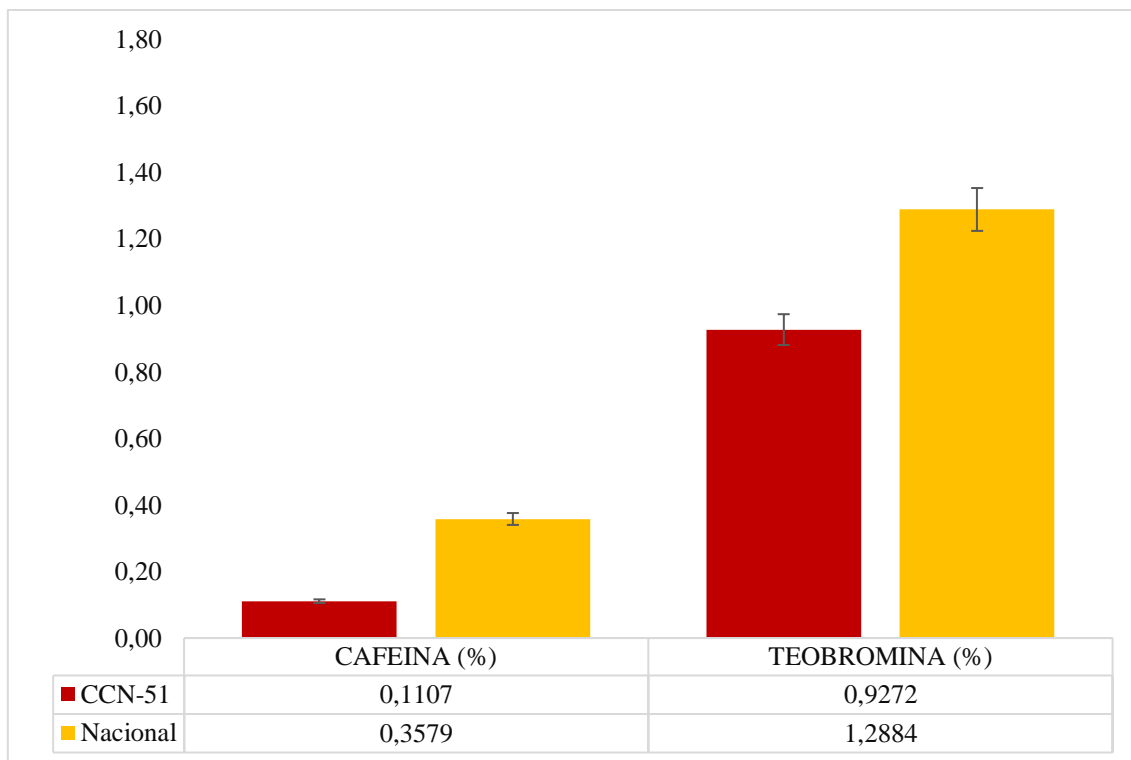


Figura 13. Metilxantinas de la cascarilla de dos variedades de cacao, Arreaga (2020)

4.2.2. Coeficiente de correlación de Pearson.

Con la finalidad de identificar los compuestos fitoquímicos responsables de la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao, mediante una prueba de correlación de Pearson, misma que, permite conocer el porcentaje de correlación entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y de metilxantinas como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Coeficiente de correlación de la actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC.

ANTIOXIDANTES	Coeficiente de Correlación de Pearson (r)		
	ABTS (%)	FRAP (%)	ORAC (%)
Epicatequina	0.1726	0.2863	-0.0519
Catequina	-0.9693	-0.9858	-0.8724
Cafeína	-0.9729	-0.9845	-0.8722
Teobromina	-0.9831	-0.9761	-0.8694

Elaborado por: Coronel Álvarez, 2020

De acuerdo a los resultados reportados en la Tabla 11 la capacidad antioxidante medida por ABTS y FRAP presenta una correlación positiva débil ($r=0,10 - 0,49$ o 10- 49%) con el contenido de Epicatequina de la cascarilla de cacao con valores de 17,26; 28,63 % respectivamente. Sin embargo, la capacidad antioxidante medida por el método de ORAC no presentó correlación alguna ($r=0,00 - 0,09$ o 0,00 - 9 %) con concentración de Epicatequina de la muestra estudiada.

En el caso de contenido de Catequina, Cafeína y Teobromina se observó que existe una correlación negativa fuerte ($r=-0,95$: -0,99 o -95: -99%) con la capacidad antioxidante medidas por los métodos de ABTS (-96,93; -97,29; -98,31%) y FRAP (-98,58; -98,45; -97,61%). Mientras que, la correlación de estos componentes con la capacidad antioxidante medida por ORAC (-87,24; -87,22; -86,94%) fue negativa moderada ($r=-0,50$: -0,94 o -50: -94%).

De acuerdo a Sotelo *et al.* (61), en cuanto a los antioxidantes totales presentes en otros residuos como las cáscaras de mazorca de cacao poseen un alto contenido de polifenoles que varían teniendo en cuenta la técnica de extracción de 23.0 a 16.40 mg EAG/g muestra y una buena capacidad antioxidante que varía con valores FRAP de 16.904,25 a 13.660,13 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$, ABTS de 22.961,57 a 11.603,12 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ y ORAC de 34.292,71 a 25.150,94 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$.

A pesar de que la presencia de antioxidantes de la cascarilla de cacao provoca la desaparición de los radicales cromógenos, en los diferentes ensayos *in vitro*, el análisis de correlación de Pearson demostró que la capacidad antioxidante de las muestras no viene dada directamente por los compuestos fenólicos y metilxantinas presentes en la cascarilla de cacao y esta puede estar asociada a otros compuestos presentes en las muestras. Estos compuestos serían los responsables de quelar iones metálicos activos redox, inactivar cadenas de radicales libres de lípidos y evitar la conversión de hidróperóxido en oxirradicales reactivos.

Cabe señalar que existen varios factores internos y externos que inciden en la calidad o cantidad de compuestos fenólicos en las plantas, como la diversidad genética (variedad y origen de la muestra), variables ambientales (intensidad lumínica, temperatura, uso de fertilizantes, lesiones), procesamiento (fermentación, secado, tostado, alcalinización) y almacenamiento (62).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se observó que existe efecto significativo ($p < 0,05$) de la variedad de la cascarilla de cacao sobre la actividad antioxidante; siendo la variedad CC-51 la que presentó mayor contenido de compuestos antioxidantes, en comparación a la variedad Nacional.
- Según el análisis de correlación de Pearson en los métodos ABTS y FRAP existieron correlaciones positivas débil a nivel de Epicatequina, mientras con Catequina, Cafeína y Teobromina las correlaciones fueron negativas fuertes; para el método ORAC las correlaciones fueron negativas respecto a todos los antioxidantes evaluados
- Los subproductos del cacao son fuentes de compuestos bioactivos de tal manera que los fitonutrientes pueden vivir en la parte interna como externa de la plata por lo que podemos valorizar esos residuos nos podría permitir un ingreso adicional para los agricultores

5.2. Recomendaciones.

- Determinar la actividad antioxidante en muestras comerciales de cascarilla de cacao y otras variedades de menor presencia en los cultivos del país.
- Identificar qué compuestos son los responsables de la capacidad de antioxidante de la cascarilla.
- Realizar un estudio económico con la finalidad de establecer el costo de la valorización de los residuos componentes bioactivos de la cascarilla de cacao.
- Estimar el volumen de residuos de cacao que existe a nivel nacional.

CAPITULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura citada.

1. Anecacao. Asociación Nacional de Exportadores Cacao. [Online].; 2020 [cited 2020 Febrero 10. Available from: <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>.
2. Arana-Analuiza A, Rugel-Jiménez E. Propuesta de aprovechamiento del desecho de mucílago de cacao en la Hacienda Santa Rita. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2017.
3. Boskou D, Tsimidou M, Blekas G. Olive oil: chemistry and technology. Polar phenolic compounds. Aristotle university of Thessaloniki. , Laboratory of food chemistry and technology; 2006.
4. Alvarez K, Quilumba F. Aprovechamiento de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la elaboración de polvo y sus usos culinarios. Guayaquil: Universidad de Guayaquil; 2018.
5. Zamora J,D. Micronutrientes en lucha por la salud. Revista Chilena de Nutrición. 2007 Marzo 12; 34(1): p. 17-26.
6. Vásquez Z,S, de Carvalho Neto D,P, Pereira G, Vandenberghe L, de Oliveira P,Z, Tiburcio PB. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. Waste ManagEMENT. 2019;; p. 72-83.
7. Batista N,N, de Andrade D, Ramos C, Días D,R, Schwan R. F. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. Food Research International. 2016;(90): p. 313-319.
8. Perea-Villamil J,A, Cadena-Cala T, Herrera-Ardila J. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. Revista Salud. 2009 Mayo-Agosto; 41(2).
9. Cuevas M,A. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz boliviano. Memorias Red-Alpha-Lagrotech. Cartagena:; 2008.

10. Castillo J. Antioxidantes en la salud, en la enfermedad y en la alimentación. Murcia: Universidad de Murcia; 2012.
11. Enriquez G. Manual de cacao orgánico: guía para productores Ecuatorianos. Manual numero 54. Quito;; 2001.
12. Ayeni L. Efecto de la asociación de la ceniza de mazorca del cacao y NPK fertilizante en propiedades del suelo, absorcion de nutrientes y rendiemento del maiz (*Zea mays*). Revista de Ciencias Americanas. 2010;; p. 79-84.
13. Ruiz-Larrea MB. Breve historia de los radicales libres. SEBBM divulgación la ciencia al alcance de la mano. Universidad del País Vasco; 2018. Report No.: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2018.04.1.
14. Corrales L,C, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova. 2012; 10(18): p. 2013-218.
15. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 2012; 27(1): p. 76-89.
16. Martínez S, Gonzáles J, Culebras M, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria. 2002; 17(6): p. 271-278.
17. Tovar A, Godinez L, Espejel F, Ramírez R. Optimization of the integral valorization process for orange peel waste using a design of experiments approach: Production of high-quality pectin and activated carbon. Waste Management. 2019;(85): p. 202-213.
18. Kazemi M, Khodayin F, Hosseini S,S, Najari Z. An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan. Waste Management. 2019;(100): p. 101-111.
19. Barazarte H, Sangronis E, Unai E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectina. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2008; 58(1): p. 64-70.

20. Alberca-Peña Y. Desarrollo de un té con cascarilla de la almendra del cacao (*Theobroma cacao* L.) fino de aroma y CCN-51. Guayaquil: Universidad de las Américas; 2018.
21. Chiriboga M. Jornaleros, grandes propietarios y exportación cacaotera, 1790-1925. Quito; 2013.
22. Sigcha-Vera CS, Zambrano-Mora IA. Características del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la obtención de alcohol etílico. Universidad de las Fuerzas Armadas; 2018.
23. Ortiz-Valbuena K, Álvarez-León R. Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguará (Huila, Colombia). Boletín Científico Centro de Museos. 2015; 19(1): p. 65–84.
24. Teneda W, Tapia C. Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de cacao (*Theobroma Cacao* L.) variedad Arriba y CCN51 para la elaboración de una infusión. Ambato: Universidad Técnica de Ambato; 2015.
25. Sánchez-Ramírez C. El chocolate amargo en la cocina cuencana actúa, nuevas recetas. Cuenca: Universidad de Cuenca; 2010.
26. Belwal T, Devkota H,P, Ramola S, Andola H,C, Bhatt I,D. Optimization of extraction methodologies and purification technologies to recover phytonutrients from food. Phytonutrients in Food. 2020;: p. 217-235.
27. Campos-Vega R, Nieto-Figueroa K,H, OomahB. D. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Vol. 81, Trends in Food Science and Technology. 2018; 81: p. 172-184.
28. Lim T,K. *Theobroma cacao*. L ; 2012.
29. Rigel J. Procedimiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos.. Maracay: Centro Nacional de Investigación Agrícola; 2005.

30. INEN. NTE INEN 0176: Cacao en grano. Requisitos. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización; 2018.
31. Aguirre J,J, De La Garza T,H, Zugasti C, Belmares C,R, Aguilar C. The optimization of phenolic compounds extrac-tion from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. Asian Pacific Journ of Tropical Biomedicine. 2013.
32. Sánchez V, El Salaus A, Yopez M, Mosquera C, Arizaga R, Cadena N. Elaboración de alimento balanceado para pollo broiler a base de subproductos de cacao (cáscara, cascarilla y placenta). Espirales Rev Multidiscip Investig. 2018; 2(13): p. 1-13.
33. Morgan P, Wollman P, Jackman S, Bowtell J. Flavanol-rich cacao mucilage juice enhances recovery of power but not strength from intensive exercise in healthy, young men. Revista Sports. 2018; 6(4): p. 1-12.
34. Vallejo C, Díaz R, Morales W, Román S, Vera J, Baren C. Del mucílago de cacao, tipo nacional y trinitario, en la obtención de jalea. Revista Espam Ciencia. 2016 Abril; 7(1): p. 51-58.
35. Teneda-Llerena W. Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.): Variedad Nacional y CCN-51. Andalucía.; 2017.
36. Villavicencio D. Desarrollo de helado mantecado a parti de mucilago de cacao (*Theobroma Cacao* L. CCN-51). Tesis de Ingeniería. Guayaquil: Universidad Católica de Santiago de Guayaquil; 2018.
37. Kusch S. Value-Added Utilization of Agro-Industrial Residues. Advances in Food Biotechnology. 2015.
38. Castillejo G, Millán S, Bulló M. Estudio controlado, randomizado, a doble estudio ciego, evaluando el efecto de un suplemento de cáscara de cacao rico en fibra sobre el tránsito colónico en pacientes pediátricos con constipación. Revista de Nutrición Hospitalaria. 2006; 21(1).

39. Europea Food Safety Authority. Theobromine as undesirable substances in animal feed Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal.; 2008.
40. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Anal Methods. 2009 Marzo; 2(1): p. 41-60.
41. Paladino S. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitisvinifera* L.). Tesis Maestría en Alimentos (Mención en ciencias). Mendoza: Universidad Nacional de San Juan; 2008.
42. Robbins R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem. 2003; 51: p. 2866-2887.
43. Siels H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. The American Journal of Clinical Nutrition. 2005; 81: p. 304-312.
44. Pisoschi A,M, Negulescu G,P. Methods for total antioxidant activity determination: A review. Revista de Bioquímica. 2012; 1(1).
45. Arreaga A. Identificaciòn del perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades CCN-51 y Nacional. Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2020.
46. Espín S, Samaniego I. Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao. In Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (Ed.), Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca, (Vol. 105) Quito: Imprenta San Mateo; 2016.
47. Sandoval S. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos Santiago de Chile: Instituto de Salud Pública Chile; 2010.
48. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med, 26(9-10). 1999; 26(9): p. 1231-1237.

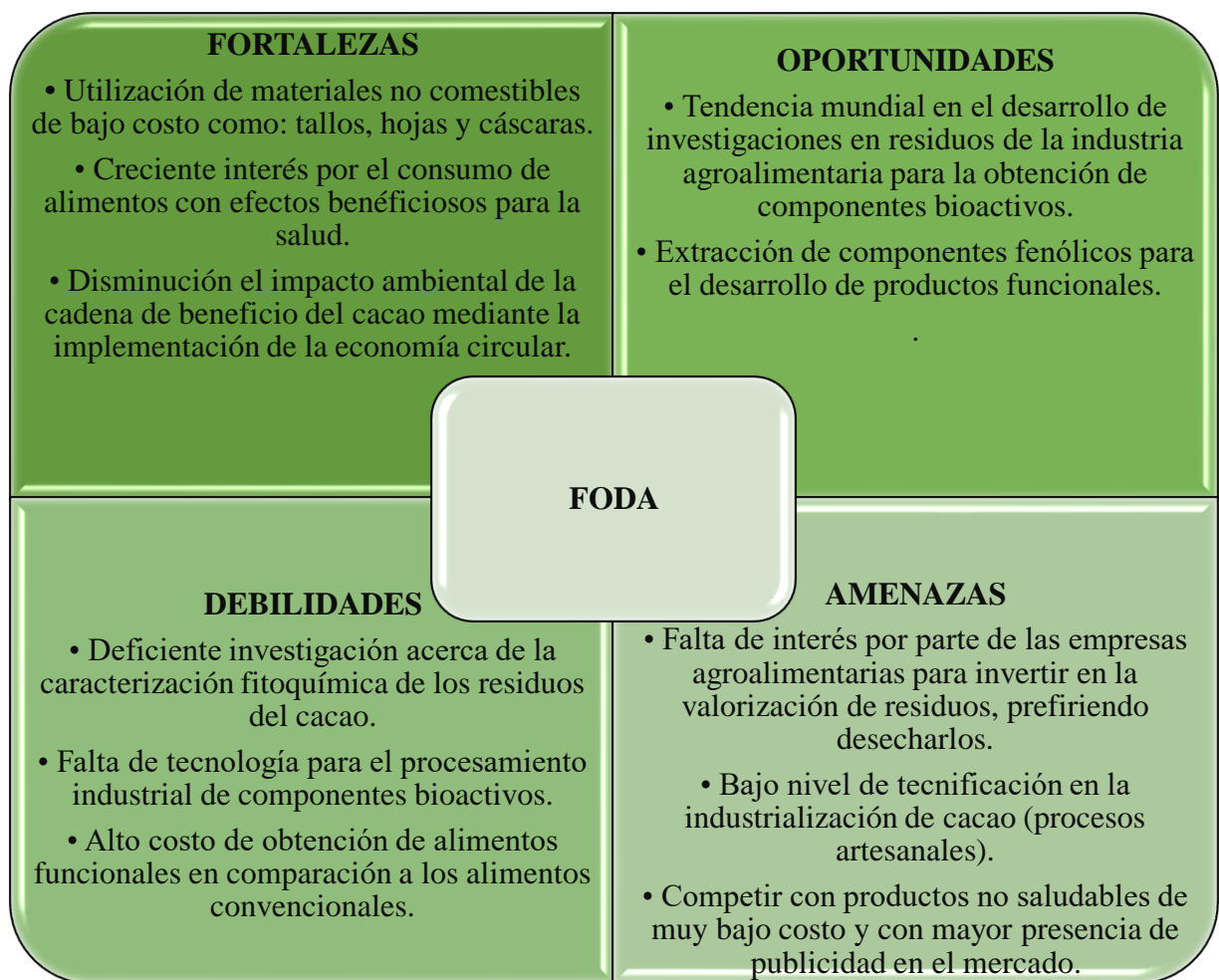
49. Benzie I,F, Strain J,J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239(1): p. 70-76.
50. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J,A, Prior R,L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem*. 2000; 50(16): p. 4437–4444.
51. Martínez R, Torres P, Meneses M,A, Figueroa J,G. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Res Int*. 2012 Noviembre; 9(1): p. 39-45.
52. Singh S, Singh R,P. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*. 2008; 24: p. 392–415.
53. Arnao M. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Food, Science y Technology*. 200 Noviembre; 11(11): p. 419-421.
54. Vivanco C,E, Matute C,L, Campo F. Caracterización físico-química de la cascarilla de *Theobroma cacao* L, variedades Nacional y CCN-51. *Conference Proceedings*. 2017; 2(1): p. 213-222.
55. Ordoñez E,S, Leon-Arevalo A, Rivera-Rojas H, Vargas E. Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*. 2019; 10(2): p. 175 – 183.
56. Guevara M, Tejera E, Granda-Albuja M,G, Iturralde G, Chisaguano-Tonato M, Granda-Albuja S, et al. Chemical composition and antioxidant activity of the main fruits consumed in the western coastal region of Ecuador as a source of health-promoting compounds. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 8(9).
57. Mazzutti S, Gonçalves L, Mezzomo , Venturi V, Salvador S. Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover

- antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018;(135): p. 52-59.
58. Samaniego I, Espín S, Quiroz J, Ortiz B, Carrillo W, García-Viguera C. Effect of the growing area on the methylxanthines and flavanols content in cocoa beans from Ecuador. *J Food Compos Anal.* 2020 Enero; 88: p. 1-31.
59. Abdul K, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Abdullah N. Antioxidant properties of cocoa pods and shells. *Malaysian Cocoa Journal*. 2014; 8: p. 49-56.
60. Zhunio BJ. Evaluación de la actividad antioxidante en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Variedades: CCN-51 y nacional. Quevedo: Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2020.
61. Sotelo L, Alvis A, Arrazola G. Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 2015 Enero-Julio; 9(1): p. 124-134.
62. Niemenak N, Rohsiusb C, Elwersb S, Ndoumoua D,O, R. L. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J Food Composition Analysis*. 2006; 19(6): p. 612-619.
63. Ramos E, Castañeda B, Ibañez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev. Acad. Perú Salud*. 2008; 15: p. 42-46.
64. S-Espín , I-Samaniego. Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao. Quito, Ecuador; 2016.
65. Ortiz J, Chungara M, Ibieta G, Alejo I, Tejeda L. Determinación de teobromina, catequina, capacidad antioxidante total y contenido fenólico total en muestras representativas de cacao Amazónico Boliviano y su comparación antes y después del proceso de fermentación. *Revista Boliviana Química*. 2019; 36(1): p. 40-50.
66. D. Q. Microencapsulación de componentes bioactivos de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*) mediante secado por aspersion. Universidad Técnica de Ambato ; 2018.

67. USDA. Nutrient data laboratory. Database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods. Washington: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos; 2010.
68. Carrillo L, Londoño J, Gil A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. Int. J. Food Sci. Technol. 2013; 60: p. 1-8.

ANEXOS

Anexo 1. FODA del problema



Anexo 2. Evidencias gráficas del proceso

Cacao CCN-51 y Nacional



Secado de cacao en madera.

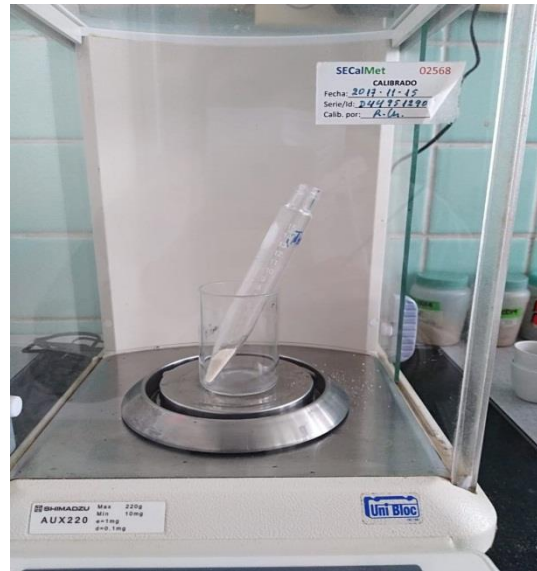
Cajas de fermentación tipo escalera.



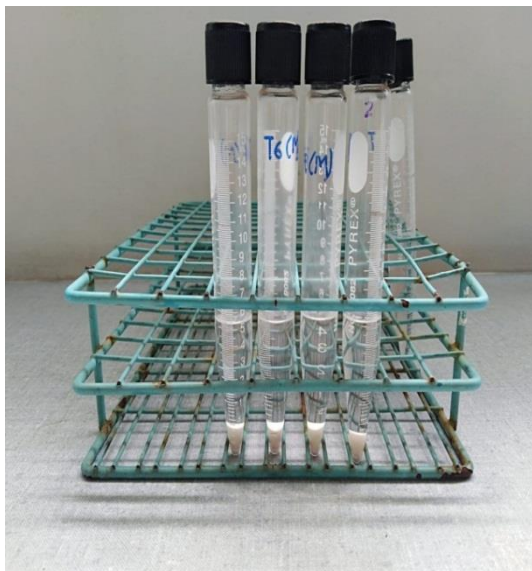
Pesado de la muestra ABTS y FRAP



Proceso de extracción .



Cuantificación de la actividad antioxidante mediante espectrofotometría UV-VIS



Descascarillado



Cascarilla



Anexo 3. Prueba t de Student aplicada en la determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) proveniente de las variedades CCN-51 y Nacional por el método ABTS

<i>Parámetro</i>	<i>Cascarilla de cacao</i>	
	<i>CCN-51</i>	<i>Nacional</i>
Media	684.253038	433.659999
Varianza	2511.503273	404.954367
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.9999	-0.9999
Diferencia hipotética de las medias	0.0000	0.0000
Grados de libertad	2	2
Estadístico t	6.1796	6.1796
P(T<=t) una cola	0.0126	0.0126
Valor crítico de t (una cola)	2.9200	2.9200
P(T<=t) dos colas	0.025201	0.025201
Valor crítico de t (dos colas)	4.3027	4.3027

Anexo 4. Prueba t de Student aplicada en la determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) proveniente de las variedades CCN-51 y Nacional por el método FRAP

<i>Parámetro</i>	<i>Cascarilla de cacao</i>	
	<i>CCN-51</i>	<i>Nacional</i>
Media	767.995918	639.512791
Varianza	163.524285	239.587992
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0.99977226	0.99977226
Diferencia hipotética de las medias	0	0
Grados de libertad	2	2
Estadístico t	82.1885432	82.1885432
P(T<=t) una cola	0.000074	0.000074
Valor crítico de t (una cola)	2.919986	2.919986
P(T<=t) dos colas	0.00014801	0.00014801
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	4.30265273

Anexo 5. Prueba t de Student aplicada en la determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) proveniente de las variedades CCN-51 y Nacional por el método ORAC

<i>Parámetro</i>	<i>Cascarilla de cacao</i>	
	<i>CCN-51</i>	<i>Nacional</i>
Media	227.2217056	209.8655608
Varianza	41.83456801	28.54084899
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0.985818504	0.985818504
Diferencia hipotética de las medias	0	0
Grados de libertad	2	2
Estadístico t	20.05435014	20.05435014
P(T<=t) una cola	0.001238616	0.001238616
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	2.91998558
P(T<=t) dos colas	0.002477232	0.002477232
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	4.30265273

