



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

Proyecto de Investigación previo  
a la obtención del Título de  
Ingeniera en Alimentos.

**Título del Proyecto de Investigación:**

“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MAZORCA DE CACAO (*Theobroma cacao*  
L.), VARIEDADES CLON CCN-51 Y COMPLEJO NACIONALxTRINITARIO.”

**Autora:**

Josselyn Meilyn Aguirre Coque

**Directora del Proyecto de Investigación:**

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

**Codirector del Proyecto de Investigación:**

Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua, Ph.D. (INIAP)

**Mocache – Los Ríos –Ecuador**

**2022**



## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **AGUIRRE COQUE JOSSELYN MEILYN**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado 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. \_\_\_\_\_

Aguirre Coque Josselyn Meilyn

C.C. 095743577-9



## CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Los suscritos, **Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y el **Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD.**, Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de Directora y Codirector del Proyecto de Investigación **CERTIFICAMOS** que el estudiante **Aguirre Coque Josselyn Meilyn**, realizó el proyecto de investigación de grado **“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MAZORCA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.), VARIEDADES CLON CCN-51 Y COMPLEJO NACIONAL TRINITARIO”**, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, bajo nuestra dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.



Firmado electrónicamente por:  
**WILMA MARIBEL  
LLERENA SILVA**

---

Ing. Wilma Llerena Silva, M.Sc.  
**DIRECTORA**



Firmado electrónicamente por:  
**IVAN RODRIGO  
SAMANIEGO  
MAIGUA**

---

Dr. Iván Samaniego Maigua, Ph.D.  
**CO-DIRECTOR**



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

Dando 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, MSc.**, y el **Dr. Iván Samaniego Maigua, Ph.D.**, Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de Directora y Co-Director del Proyecto de Investigación, titulado “**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MAZORCA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.), VARIETADES CLON CCN-51 Y COMPLEJO NACIONALxTRINITARIO**” de autoría del estudiante de la Carrera de Ingeniería en Alimentos, Aguirre Coque Josselyn Meilyn, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es el 4% el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



### Document Information

Analyzed document	TESIS- JOSSELYN AGUIRRE COQUE - CORREGIDA.pdf (D150609965)
Submitted	2022-11-22 18:47:00
Submitted by	
Submitter email	josselyn.aguirre2016@uteq.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	wllerenas.uteq@analysis.urkund.com



Firmado electrónicamente por:  
**WILMA MARIBEL  
LLERENA SILVA**

Ing. Wilma Llerena Silva, M.Sc.

**DIRECTORA**



Firmado electrónicamente por:  
**IVAN RODRIGO  
SAMANIEGO  
MAIGUA**

Dr. Iván Samaniego Maigua, Ph.D.

**CO-DIRECTOR**



## CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

**Título:**

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MAZORCA DE CACAO (*Theobroma  
cacao* L.), VARIEDADES CLON CCN-51 Y COMPLEJO  
NACIONALxTRINITARIO.**

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

Aprobado por:



Firmado electrónicamente por:  
**JAIME  
FABIAN VERA**

---

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

**Ing. Jaime Vera Chang, M.Sc.**



Firmado electrónicamente por:  
**CAROL DANIELA  
COELLO LOOR**

---

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

**Ing. Rossy Rodríguez Castro, M.Sc.**



Firmado electrónicamente por:  
**ROSSY LISBETH  
RODRIGUEZ CASTRO**

---

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

**Ing. Carol Coello Loor, M.Sc.**

**Mocache – Los Ríos –Ecuador**

**2022**

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por guiar mi camino, brindarme fortaleza y capacidad, permitiéndome concluir con mi objetivo.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que hacen la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y Facultad de Ciencias de la Industria y Producción, que aportaron en mi formación profesional y formar parte del Proyecto del Fondo competitivo FOCICYT 2020-2021: VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE LA CADENA DE BENEFICIO DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS CON PROPÓSITOS FUNCIONALES. QUEVEDO- LOS RÍOS.

A la Asociación “La Cruz” del cantón Mocache por permitirme llegar a cabo la recolección de los residuos de cacao y el procesamiento postcosecha y a la Estación Experimental Santa Catalina, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en especial al Departamento de Nutrición y Calidad, bajo la coordinación del Dr. Iván Samaniego Ph.D., por permitirme llevar a cabo la ejecución de esta investigación.

En especial a mi directora de tesis, M.Sc. Wilma Maribel Llerena Silva, gracias por su paciencia, orientación y guiarme en el desarrollo de esta investigación compartiendo sus valiosos conocimientos, su experiencia y profesionalismo. Al Dr. Iván Samaniego PhD. por brindarme su apoyo, direccionándome con su experiencia y sabiduría de manera especial en el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Agradecer al personal del (LSAIA), Ing. Bladimir Ortiz, Q. A. Verito Arias, y en especial a la Q.A. Yar Narváez Dayra Michel, gracias por su ayuda brindándome sus conocimientos y enseñanzas en el transcurso del desarrollo experimental del presente proyecto de investigación.

De igual manera agradecer a mi amiga Jomira Villegas Rosales, por estar cuando más la necesito, gracias por los buenos momentos que hemos compartido y aprendido tanto profesional como personalmente en toda esta etapa universitaria, por tu amabilidad y generosidad.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación principalmente a Dios, por darme la sabiduría, fuerzas y ser mi guía en el transcurso de mi vida, por permitirme conseguir uno de los anhelos más deseados y haber llegado a este momento tan importante de culminar con éxito mi carrera profesional. A mi familia, mis abuelos María Arreaga, Agapito Coque y hermanos Kevin, Iker y Anderson Aguirre Coque, por estar siempre presente, en especial a mi madre Angélica María Coque Arreaga, por ser el pilar fundamental en mi vida y apoyo incondicionalmente brindándome su amor, esfuerzo, paciencia y creer en mí a lo largo de mi vida y formación profesional.

A mis hermanas Dagmar Rodríguez y Denisse Coque Arriaga, mis tíos Manuel, Gloria, Ángel y Washington Coque Arreaga, Alfredo Rodríguez Villasnay por el apoyo incondicional, consejos y enseñarme a afrontar las dificultades, motivándome siempre a seguir adelante. Y todas las personas especiales en mi vida que me acompañaron en esta etapa, de formación académica. En especial al Ing. Ángel Fernández Escobar, por brindarme su apoyo incondicional y fortaleza, por sus valiosos consejos que me han permitido crecer tanto personal, como académicamente.

Para ese ser especial en vida que me motiva siempre, brindándome su amor y paciencia, estando todo este tiempo a mi lado. También a mi mejor amiga Jerly Loor Vélez, por brindarme su cariño, apoyo y amistad incondicional, siempre has estado ahí apoyándome cuando más lo necesitaba. Por ambas motivarnos siempre a seguir adelante y cumplir nuestras metas con éxito, gracias por todo Best friend.

## RESUMEN EJECUTIVO

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es un super alimento que se ha venido estudiando ampliamente a lo largo del tiempo, debido a su actividad antioxidante y propiedades benéficas para la salud. Sin embargo, en los últimos años existe un interés potencial en la caracterización fitoquímica y funcional de los residuos de la cadena de beneficio del cacao (mazorca). El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de antioxidantes totales (antocianinas, carotenoides, polifenoles, flavonoides), y actividad antioxidante (ABTS<sup>+</sup> y FRAP) de residuos provenientes de dos variedades de cacao ampliamente cultivadas en Ecuador con fines de exportación: clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario. Las determinaciones analíticas se realizaron mediante métodos colorimétricos empleando espectrofotometría UV-vis. De acuerdo con los resultados, la mazorca del clon CCN-51 presentó el mayor contenido de polifenoles y flavonoides totales, con valores de 38.13 mg AGE•g<sup>-1</sup> y 9,74 mg CE•g<sup>-1</sup>; respectivamente. Mientras que, las mazorcas de la variedad complejo NacionalxTrinitario presentaron valores de 35.58 mg AGE•g<sup>-1</sup> y 9,02 mg CE•g<sup>-1</sup>. Sin embargo, el contenido de carotenoides totales fue superior en muestras de mazorca de la variedad complejo NacionalxTrinitario (8.09 mg•g<sup>-1</sup>), que en el clon CCN-51 (4.16 mg•g<sup>-1</sup>). La actividad antioxidante presentó el mismo comportamiento que el contenido de antioxidantes totales, siendo mayor en mazorcas de la variedad clon CCN-51, que el complejo NacionalxTrinitario tanto para ABTS<sup>+</sup> (489,41 μM TE• g<sup>-1</sup>), como para FRAP (169,67 μM TE •g<sup>-1</sup>). Las opciones de valorización de subproductos o residuos del sector agroalimentario presentan un potencial interesante para la obtención de compuestos bioactivos(antioxidantes) y de uso industrial (fibra dietaría, pectina, minerales y teobromina). Esto permitirá aprovechar uno de los principales desechos de la cadena del beneficio del cacao (mazorca), que representa entre el 67-76% del peso del fruto.

**Palabras clave:** valorización de residuos, economía circular, polifenoles, flavonoides, ABTS<sup>+</sup>, FRAP.

## ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.), is a superfood that has been extensively studied over time, due to its antioxidant activity and beneficial properties for health. However, in recent years there is potential interest in the phytochemical and functional characterization of residues from the cocoa processing chain (cob). The objective of this research was to determine the content of total antioxidants (anthocyanins, carotenoids, polyphenols, flavonoids), and antioxidant activity (ABTS<sup>+</sup> and FRAP) of residues from two varieties of cocoa widely grown in Ecuador for export purposes: clone CCN- 51 and NacionalxTrinnitarian complex. Analytical determinations were performed by colorimetric methods using UV-vis spectrophotometry. According to the results, the ear of clone CCN-51 presented the highest content of total polyphenols and flavonoids, with values of 38.13 mg AGE•g<sup>-1</sup> and 9.74 mg CE•g<sup>-1</sup>; respectively. While the ears of the NacionalxTrinnitarian complex variety presented values of 35.58 mg AGE•g<sup>-1</sup> and 9.02 mg CE•g<sup>-1</sup>. However, the content of total carotenoids was higher in cob samples of the complex NacionalxTrinitario variety (8.09 mg•g<sup>-1</sup>), than in clone CCN-51 (4.16 mg•g<sup>-1</sup>). The antioxidant activity presented the same behavior as the content of total antioxidants, being higher in the ears of the CCN-51 clone variety, than the NacionalxTrinnitarian complex for both ABTS<sup>+</sup> (489.41 μM TE• g<sup>-1</sup>) and FRAP (169 .67 μM TE •g<sup>-1</sup>). The options for the recovery of by-products or waste from the agri-food sector have interesting potential for obtaining bioactive compounds (antioxidants) and for industrial use (dietary fiber, pectin, minerals, and theobromine). This will make it possible to take advantage of one of the main waste products in the cocoa benefit chain (cob), which represents between 67-76% of the weight of the fruit.

**Keywords:** waste recovery, circular economy, polyphenols, flavonoids, ABTS<sup>+</sup>, FRAP.

## TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO .....	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO .....	v
DEDICATORIA .....	vii
RESUMEN EJECUTIVO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
TABLA DE CONTENIDO .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xvii
CÓDIGO DOUBLIN .....	xviii
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. ....	6
Pronóstico. ....	6
1.1.2.Formulación del problema. ....	7
1.1.3.Sistematización del problema. ....	7
1.2.Objetivos. ....	8
	x

1.2.1.Objetivo general.....	8
1.2.2.Objetivos específicos.....	8
1.3.Justificación.....	9
CAPÍTULO II.....	10
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	10
2.1.Marco Conceptual.....	11
2.2.Marco Referencial.....	13
2.2.1.Cacao.....	13
2.2.2.Cacao en Ecuador.....	13
2.2.3.Variedades del cacao:.....	13
2.2.4.Requerimientos edáficos del cacao.....	16
2.2.5.Post-cosecha del cacao.....	16
2.2.6.Cadena de producción del cacao en el Ecuador.....	17
2.2.7.Residuos de la cadena de beneficio del cacao.....	17
2.2.8.Mazorca.....	18
2.2.9.Economía circular.....	18
2.2.10.Valorización de residuos.....	18
2.2.11.Biorrefinería.....	19
2.2.12.Biocompuestos.....	19
2.2.13.Polifenoles.....	20
2.2.14.Flavonoides.....	20
2.2.15.Carotenoides.....	21
2.2.16.Antocianinas.....	21
2.2.17.Antioxidantes.....	22
2.2.18.Oxidación.....	22
2.2.19.Sistema antioxidante naturales.....	22
2.2.20.Actividad antioxidante.....	23

2.2.21.Radicales libres. ....	23
2.2.22.Cuantificación de la actividad antioxidante. ....	24
CAPÍTULO III.....	26
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	26
3.1.Localización. ....	27
3.2.Tipos de investigación.....	27
3.2.1.Investigación Exploratoria. ....	28
3.2.2.Investigación experimental. ....	28
3.3.Método de investigación. ....	28
3.3.1.Método inductivo – deductivo. ....	28
3.3.2.Métodos estadísticos. ....	28
3.4.Fuentes de recopilación de información. ....	28
3.4.1.Fuentes primarias. ....	28
3.4.2.Fuentes secundarias.....	29
3.5.Diseño de la investigación. ....	29
3.5.1.Esquema del análisis de varianza. ....	30
3.5.2.Análisis de correlación de Pearson. ....	31
3.6.Instrumentos de investigación.....	32
3.6.1.Variable a evaluar.....	32
3.6.2.Variable independientes. ....	32
3.6.3.Variable dependientes.....	32
3.7.Extracción de compuestos bioactivos. ....	34
3.7.1.Antioxidantes totales. ....	34
3.7.2.Actividad antioxidante. ....	35
3.8.Recursos Humanos y Materiales. ....	36
3.8.1.Recursos Humanos.....	36
3.8.2.Materiales.....	36

CAPÍTULO IV .....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
4.1.Resultados y Discusión .....	39
4.1.1.Antioxidantes totales.....	39
4.1.2.Actividad Antioxidante.....	48
CAPÍTULO V.....	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	57
5.1.Conclusiones.....	58
5.2.Recomendaciones.....	59
CAPÍTULO VI .....	60
BIBLIOGRAFÍA .....	60
6.1.Bibliografía Consultada.....	61
CAPITULO VII.....	68
ANEXOS .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Requerimientos químicos y nutricionales del suelo para cultivos de cacao.....	16
<b>Tabla 2.</b> Localización del trabajo experimental.....	27
<b>Tabla 3.</b> Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao. .....	30
<b>Tabla 4.</b> Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de actividad antioxidante en mazorca de cacao.....	31
<b>Tabla 5 -</b> Matriz de correlación para relacionar el contenido de antioxidantes totales (polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas) y actividad antioxidante en residuos de cacao. ....	32
<b>Tabla 6.</b> Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de Carotenoides Totales.....	41
<b>Tabla 7.</b> Validación de la curva de calibración de ácido gálico para el método de determinación de polifenoles totales. ....	43
<b>Tabla 8.</b> Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de Polifenoles Totales.....	44
<b>Tabla 9.</b> Validación de la curva de calibración de catequina para el método de determinación de flavonoides totales. ....	46
<b>Tabla 10.</b> Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de Flavonoides Totales. ....	47
<b>Tabla 11.</b> Validación de la curva de calibración de Trolox ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para el método de determinación de actividad antioxidante (ABTS <sup>+</sup> ).....	49
<b>Tabla 12.</b> Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de ABTS <sup>+</sup> .....	51
<b>Tabla 13.</b> Validación de la curva de calibración de Trolox ( $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para el método de determinación de actividad antioxidante (FRAP). ....	53

<b>Tabla 14.</b> Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de FRAP. ....	54
<b>Tabla 15.</b> Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de Ishikawa para el análisis de causa-efecto del problema considerado en este estudio.....	5
<b>Figura 2.</b> Cacao nacional.....	14
<b>Figura 3.</b> Cacao CCN – 51.....	14
<b>Figura 4.</b> Cacao Forastero.....	15
<b>Figura 5.</b> Cacao Trinitario .....	15
<b>Figura 6.</b> Esquema del concepto economía circular.....	18
<b>Figura 7.</b> Diagrama de procedimiento experimental de la mazorca.....	33
<b>Figura 8.</b> Transformación estructural y cambio de coloración de las antocianinas por efecto del pH.....	39
<b>Figura 9.</b> Contenido de carotenoides totales en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).....	40
<b>Figura 10.</b> Curva de calibración de polifenoles totales.....	42
<b>Figura 11.</b> Contenido de polifenoles totales en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).....	43
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración de flavonoides totales .....	45
<b>Figura 13.</b> Contenido de flavonoides totales en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).....	46
<b>Figura 14.</b> Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS <sup>+</sup> .....	48
<b>Figura 15.</b> Actividad antioxidante por el método ABTS <sup>+</sup> , en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).....	50
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por FRAP.....	52
<b>Figura 17.</b> Actividad antioxidante por el método FRAP, en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).....	53

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Recepción del cacao para la extracción de la cáscara. ....	69
<b>Anexo 2.</b> Muestra de la mazorca de cacao Liofilizada. ....	69
<b>Anexo 3.</b> Extracción de los compuestos bioactivos.....	70
<b>Anexo 4.</b> Medición de la absorbancia. ....	71
<b>Anexo 5.</b> Determinación de flavonoides totales. ....	71
<b>Anexo 6.</b> Determinación de actividad antioxidante.....	72

## CÓDIGO DOUBLIN

<b>Título:</b>	Determinación del contenido de antioxidantes y actividad antioxidante de mazorca de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.), variedades clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario.
<b>Autor/a:</b>	Aguirre Coque Josselyn Meilyn
<b>Palabras claves:</b>	valorización de residuos, economía circular, polifenoles, flavonoides, ABTS <sup>+</sup> , FRAP.
<b>Fecha de publicación:</b>	
<b>Editorial:</b>	Quevedo, UTEQ, 2022
<b>Resumen:</b>	<p>El cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), es un super alimento que se ha venido estudiando ampliamente a lo largo del tiempo, debido a su actividad antioxidante y propiedades benéficas para la salud. Sin embargo, en los últimos años existe un interés potencial en la caracterización fitoquímica y funcional de los residuos de la cadena de beneficio del cacao (mazorca). El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de antioxidantes totales (antocianinas, carotenoides, polifenoles, flavonoides), y actividad antioxidante (ABTS<sup>+</sup> y FRAP) de residuos provenientes de dos variedades de cacao ampliamente cultivadas en Ecuador con fines de exportación: clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario. Las determinaciones analíticas se realizaron mediante métodos colorimétricos empleando espectrofotometría UV-vis. De acuerdo con los resultados, la mazorca del clon CCN-51 presentó el mayor contenido de polifenoles y flavonoides totales, con valores de 38.13 mg AGE•1g<sup>-1</sup> y 9,74 mg CE•g<sup>-1</sup>; respectivamente. Mientras que, las mazorcas de la variedad complejo NacionalxTrinitario presentaron valores de 35.58 mg AGE•g<sup>-1</sup> y 9,02 mg CE•g<sup>-1</sup>. Sin embargo, el contenido de carotenoides totales fue superior en muestras de mazorca de la variedad complejo NacionalxTrinitario (8.09 mg•g<sup>-1</sup>), que en el clon CCN-51 (4.16 mg•g<sup>-1</sup>). La actividad antioxidante presentó el mismo comportamiento que el contenido de antioxidantes totales, siendo mayor en mazorcas de la variedad clon CCN-51, que el complejo NacionalxTrinitario tanto para ABTS<sup>+</sup> (489,41 μM TE• g<sup>-1</sup>), como para FRAP (169,67 μM TE •g<sup>-1</sup>). Las opciones de valorización de subproductos o residuos del sector agroalimentario presentan un potencial interesante para la obtención de compuestos bioactivos(antioxidantes) y de uso industrial (fibra dietaria, pectina, minerales y teobromina). Esto permitirá aprovechar uno de los principales desechos de la cadena del beneficio del cacao (mazorca), que representa entre el 67-76% del peso del fruto.</p> <p><b>Abstract:</b> Cocoa (<i>Theobroma cacao</i> L.), is a superfood that has been extensively studied over time, due to its antioxidant activity and beneficial properties for health. However, in recent years there is potential interest in the phytochemical and functional characterization of residues from the cocoa processing chain (cob). The objective of this research was to determine the content of total antioxidants (anthocyanins, carotenoids, polyphenols, flavonoids), and antioxidant activity (ABTS<sup>+</sup> and FRAP) of residues from two varieties of cocoa widely grown in Ecuador for export purposes: clone CCN- 51 and NationalxTrinitarian complex. Analytical determinations were performed by colorimetric methods using UV-vis spectrophotometry. According to the results, the ear of clone CCN-51 presented the highest content of total polyphenols and flavonoids, with values of 38.13 mg AGE•g<sup>-1</sup> and 9.74 mg CE•g<sup>-1</sup>; respectively. While the ears of the NationalxTrinitarian complex variety presented values of 35.58 mg AGE•g<sup>-1</sup> and 9.02 mg CE•g<sup>-1</sup>. However, the content of total carotenoids was higher in cob samples of the complex NacionalxTrinitario variety (8.09 mg•g<sup>-1</sup>), than in clone CCN-51 (4.16 mg•g<sup>-1</sup>). The antioxidant activity presented the same behavior as the content of total antioxidants, being higher in the ears of the CCN-51 clone variety, than the NationalxTrinitarian complex for both ABTS<sup>+</sup> (489.41 μM TE• g<sup>-1</sup>) and FRAP (169 .67 μM TE •g<sup>-1</sup>). The options for the recovery of by-products or waste from the agri-food sector have interesting potential for obtaining bioactive compounds (antioxidants) and for industrial use (dietary fiber, pectin, minerals, and theobromine). This will make it possible to take advantage of one of the main waste products in the cocoa benefit chain (cob), which represents between 67-76% of the weight of the fruit.</p>
<b>Descripción:</b>	89 hojas A4, 29 x 21 cm + CD-ROM
<b>URL:</b>	

# INTRODUCCIÓN

Los granos de cacao son las semillas crudas, fermentadas o sin fermentar producto del árbol de *Theobroma cacao* L., perteneciente a la familia esterculiácea. El fruto naciente de este árbol comúnmente se denomina mazorca, se encuentra rodeado de un mesocarpio y en su interior contiene una pulpa viscosa de color blanquecino (10 – 15 % de glucosa y fructosa) con un aproximado de 20 a 50 semillas o granos. La mazorca puede llegar a medir alrededor de 15 – 25 cm de largo por 7 – 10 cm de ancho. La mazorca varía su forma, tamaño y color dependiendo de la variedad [1].

La producción de cacao dentro del territorio ecuatoriano representa un rubro importante para su economía desde el año 1635, gracias al incremento de divisas por su exportación internacional; que inició en la época de la Colonia. Sin embargo, hoy en día ocupa el tercer lugar en cuanto a exportaciones del sector agrícola, junto al banano y el mercado de flores. El cacao ecuatoriano disfruta de un amplio reconocimiento mundial en regiones de Europa, Asia y Norte América siendo producto objetivo de grandes empresas chocolateras por sus particularidades, debido a las condiciones edáficas y bioclimáticas que existe en el país [2].

Al consumo de cacao se asocian múltiples propiedades funcionales debido a que son ricos en polifenoles los cuales, cuenta con una gran capacidad antioxidante que ayudan a delimitar y prevenir la acción oxidativa de los lípidos y radicales libres que perjudican al organismo. A nivel celular, los radicales libres son causantes del aumento del de patologías como cáncer, enfermedades cardiovasculares y demás enfermedades del tipo degenerativo. La tendencia alimenticia actual recae en alimentos que confieran un beneficio como el del cacao donde relacionan su contenido de polifenoles con la disminución de dolencias como la presión arterial, efectos analgésicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, inmunitarios, antimutagénica, etc.[3].

Además de estar relacionados a la calidad organoléptica, como su pigmentación y sabor de los alimentos de origen vegetal a los que integran, los compuestos fenólicos han demostrado innumerables veces ser compuestos eficaces como antioxidante. En la naturaleza encontramos naturalmente alimentos de colores rojo, azul violeta, naranja y púrpura (antocianidinas) coloraciones que destacan tal actividad antioxidante propia los mismos [4].

El grano del cacao y sus productos derivados, son ricos en contenido tales como catequinas, procianidinas y antocianidinas, son los llamados compuestos bioactivos, con la principal cualidad de ser potentes antioxidantes y brindar una gran cantidad de efectos beneficiosos, dado que su consumo está asociado a una disminución de enfermedades ocasionados por el estrés oxidativo. El grano del cacao es aprovechado ampliamente en aspecto gracias a sus compuestos bioactivos; sin embargo, los estudios demuestran que dentro de su ciclo de producción se desaprovechan gran cantidad de materias residuales del fruto que pueden poseer el mismo valor biológico [1].

Esta gran cantidad de residuos provenientes de la cadena de beneficio del cacao, no son aprovechados ni tienen una disposición final, esto ocasiona un fuerte problema de índole ambiental, dado que en las plantaciones estos restos se degradan, ocasionando desequilibrio en la riqueza del suelo, acidificando el suelo, disminuyendo sus nutrientes y logrando focos de proliferación de microorganismos, hongos y plagas. El manejo inadecuado de estos residuos se evidencia en la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), moniliasis (*Moniliophthora roreri*) y fitóptora (*Phytophthora spp.*) que en casos más graves pueden afectar hasta un 90 % de la producción. [5].

Dentro de la actividad agrícola concerniente al cacao, los subproductos desechados del fruto (mazorca) solo se aprovecha económicamente el 20 % del peso (grano), siendo el 80 % restante considerado como un desecho orgánico. La tendencia de la industria alimentaria por crear alimentos con características beneficiosas va en aumento, esto abre una ventana de oportunidades muy importante para el estudio de estos residuos (mazorca, cascarilla, placenta y mucílago). Para generar un valor agregado a productos alimenticios se incorporan fitonutrientes, dentro de su elaboración, lo que generan una ganancia económica por su aprovechamiento y disminuyen su efecto negativo al medio ambiente [6].

Existe muy poca información referente a la reutilización de estos residuos, por lo que, el objetivo del presente estudio es la caracterización de la mazorca para analizar sus propiedades antioxidantes posibles en clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario, con los datos resultantes de esta investigación se pretende analizar la viabilidad de estos compuestos para integrarlos a los alimentos de nuestra ingesta habitual.

## **CAPÍTULO I**

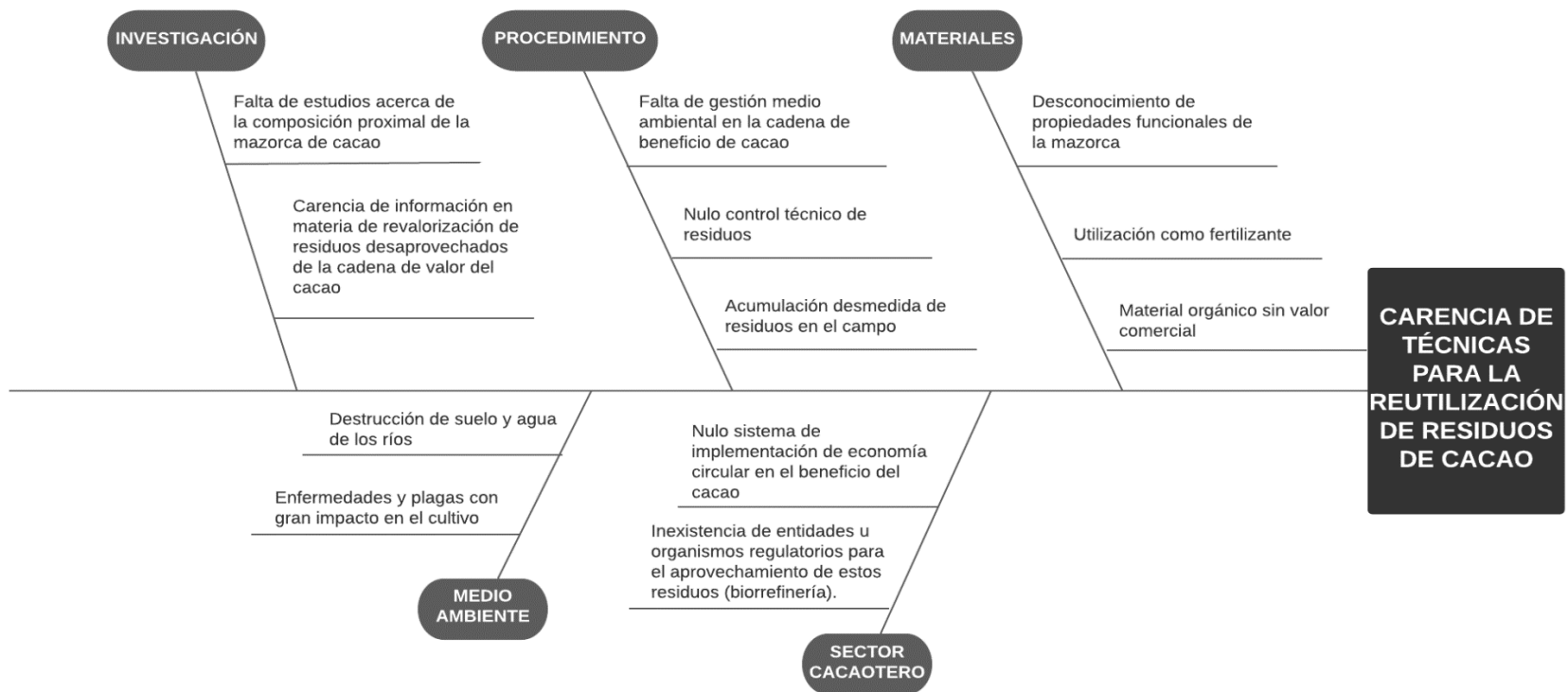
### **CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de la investigación.**

### **1.1.1. Planteamiento del problema.**

La producción de cacao sufre de lo que a simple vista no representa una gran problemática para la industria cacaotera; sin embargo, las insuficientes alternativas o técnicas para la reutilización (biorrefinería) de los residuos que surgen de la cadena de beneficio del cacao es una realidad. Desde la perspectiva del diagrama causa – efecto de Ishikawa (Figura 1), se establecen las principales causales que dan pie a este problema, las cuales están relacionadas al área de investigación, al aspecto metodológico, a los materiales, el medio ambiente en el que se produce y el sector cacaotero como industria. La falta de estudios de la mazorca en cuanto a su composición es una gran carencia que incide a su vez en la información disponible que se pueda utilizar para la revalorización y aprovechamiento de este residuo, no se conocen sus propiedades funcionales de manera específica, solo su utilidad como fertilizante y material orgánico que no posee ningún tipo de valor comercial o industrial.

El nulo control técnico para el manejo de residuos dentro de la producción del cacao, genera una acumulación desmedida que demuestra que no existe ningún tipo de gestión organizada que controle la cadena y los residuos que no tienen destino industrial alguno. Más bien son fuente de contaminación y destrucción del suelo y del agua de ríos cercanos que puedan alimentarse negativamente de este foco de humedad, desmineralización y acidificación del suelo, que además son el hogar perfecto para plagas e insectos, afectan la producción futura y el ecosistema que contiene a la finca de producción. En Ecuador, no existe la tendencia de utilizar nuevamente subproductos de la cadena del cacao y aprovechan al máximo su potencia, por lo que, conceptos como biorrefinería o valorización de residuos están relegados de este tipo de producción.



*Figura 1. Diagrama de Ishikawa para el análisis de causa-efecto del problema considerado en este estudio.*

*Elaborado por: Aguirre Josselyn, 2022.*

## **Diagnóstico.**

Como una de las materias primas industrialmente más importante a nivel internacional por su demanda, el cacao ecuatoriano está muy bien posicionado en el mercado mundial y es muy apetecido por las chocolateras de todas las regiones, pero solo se refiere a la utilización de la almendra para la producción de chocolates, confites y un gran sin número de productos muy populares de consumo habitual. La mazorca como tal es totalmente desaprovechada, siendo que la única finalidad de la misma es terminar como abono orgánico del mismo suelo donde son producidas y sin ningún tipo de valor económico que vuelva de interés de las cacaoteras darles un reproceso darles un fin más comercial.

De la cadena productiva del cacao resultan varios tipos de residuos como la mazorca, placenta, mucílago y cascarilla, a los cuales no se les ha estudiado lo suficiente como para brindarles un valor científico que permita su utilización en otras industrias y dejen de acumularse en los suelos y ríos cercanos a las plantaciones de cacao donde solo se convierten en impacto negativo para el ambiente afectando a la mismos productores, siendo así necesario al ver las capacidades funcionales de la almendra que es rica en antioxidante buscar darle el mismo interés a sus contrapartes desaprovechadas (mazorca).

Causas necesarias para encaminar esta problemática surgida de la necesidad de crear movimientos que promuevan la utilización de estos residuos de cacao que se encuentran detallados en la (Figura 1).

## **Pronóstico.**

Durante décadas la producción de cacao se ha enfocado en la producción de la almendra, creando una gran contaminación derivada de la inutilización de los demás componentes del fruto, esto genera una gran afectación tanto al ecosistema, como a los mismos productos y su economía a futuro ya que se dañan sus suelos donde producen y los ríos que utilizan como fuentes de riego perdiendo calidad.

### **1.1.2. Formulación del problema.**

¿Cuál será el contenido de antioxidantes totales y de actividad antioxidante presente en la mazorca de cacao de dos variedades?

### **1.1.3. Sistematización del problema.**

¿Cuál será el contenido polifenoles totales en la variedad clon CCN-51?

¿Cuál será el contenido polifenoles totales en la variedad complejo NacionalxTrinitario?

¿En qué variedad de cacao existirá una mayor actividad antioxidante?

## **1.2. Objetivos.**

### **1.2.1. Objetivo general.**

Determinar el contenido de antioxidantes totales y actividad antioxidante de mazorca de cacao (*Teobroma cacao* L.)

### **1.2.2. Objetivos específicos.**

- Determinar el contenido de antioxidantes totales (antocianinas, carotenoides, polifenoles y flavonoides) de mazorca de cacao (variedades Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario).
- Evaluar la actividad antioxidante de mazorca de cacao (variedades Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario).
- Evaluar el efecto de la variedad en el contenido de bioactivos y actividad antioxidante de mazorca de cacao: variedades Trinitario y Complejo nacional.

### **1.3. Justificación.**

Los productos derivados del cacao como pasta, polvo, manteca y licor son la base de la industria cacaotera, son empleados para elaboración de chocolates, bebidas y otras formulaciones que son muy apetecidas por los consumidores incluso con aplicaciones en farmacéutica y cosméticos. Estos productos y subproductos provienen solamente del grano de cacao extraído del fruto (mazorca). La mazorca es considerada un desecho poco utilizado, la tendencia de alimentos como los productos elaborados con el cacao que son ricos en antioxidantes va en auge. Recientemente el mucílago es objetivo para estudios de caracterización, y se ha demostrado que son ricos en azúcares aprovechables para las industrias, lo que permite un margen amplio de estudio para residuos como la mazorca y similares y analizar sus beneficios nutricionales y técnicos posibles dentro de su composición aún desconocida[7], [8].

Los residuos del ciclo productivo del cacao son desechados, como el caso de las mazorcas que simplemente son quemadas, arrojadas a los ríos o dejadas en los plantíos para servir como abono orgánico, como focos de generación de daño al medio ambiente. La razón principal es el poco desarrollo de la agroindustria para transformar estos subproductos en ingredientes con valor agregado, por lo que, no representa ningún beneficio económico para las industrias cacaoteras. Además de su capacidad antioxidante, las mazorcas son potenciales fuentes ricas en fibra dietaria, pectina, vitaminas y minerales, que podrían ser consideradas para la elaboración de alimentos nutricionales no solo para consumo humano sino también para animales y otras industrias de igual importancia y están sujetas a una posible implementación de un sistema de economía circular para proporcionar este valor agregado [8]–[10].

El perfil de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como los compuestos polifenólicos es aún desconocido, no existe información que respalde la presencia y la riqueza de estos compuestos en la mazorca, el objetivo de este trabajo es la caracterización de mazorca de cacao de las variedades clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario, para la obtención de compuestos de alto valor biológico para uso industrial. Posteriormente esta información se usará para determinar la posibilidad de incorporar estos compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides, carotenoides y antocianinas) con la finalidad de contribuir en propiedades funcionales de alimentos que forman parte habitual de la dieta.

## **CAPÍTULO II**

# **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Marco Conceptual.**

### **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].

### **Antioxidante.**

Por definición, un antioxidante es cualquier sustancia que retrasa o previene la oxidación de un sustrato oxidable a pesar de estar presente en concentraciones más bajas que el sustrato. Las células y los órganos del cuerpo tienen sistemas antioxidantes, los cuales pueden ser enzimáticos, no enzimáticos o proteínas de unión. Todos actúan sinérgicamente para neutralizar las diferentes especies reactivas del oxígeno, formando una red de antioxidantes [12].

### **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 [11].

### **Radicales libres.**

Un radical libre es una molécula que cada día se produce en nuestro organismo como consecuencia de las reacciones biológicas que causan las células, son moléculas reactivas, importantes para ejecutar determinadas funciones y conservar el estado de salud. Habitualmente se desarrollan este conjunto de reacciones en el organismo y se engloba como “respiración celular”. Estas reacciones son importantes para la vida celular, esta producción de radicales libres poseen efectos negativos con el tiempo, alterando las membranas de las células y el material genético (ADN de la célula) [13].

## **Economía circular.**

Una economía circular es aquella que intercambia el ciclo típico de fabricación, uso y disposición a favor de la mayor reutilización y reciclaje posible. Cuanto más tiempo se usan los materiales y los recursos, más valor se extrae de ellos [14].

## **Valorización de residuos.**

La operación cuyo resultado principal es que el residuo sirva a una finalidad útil al sustituir a otros materiales que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular. La preparación del residuo para cumplir una función particular, en la instalación o en la economía en general. El procedimiento de valorización a seguir, dependerá de la composición de los residuos, requiriendo de métodos diferentes según se trate de residuos orgánicos o inorgánicos. Del mismo modo, se deben seguir protocolos específicos de recolección y traslado cuando se trata la gestión de residuos peligrosos. Por tanto, es importante contar con un gestor de residuos que cumpla con la normativa vigente, y asegure los tratamientos correctos en cada caso [15].

## **Biocompuestos.**

Los compuestos bioactivos se definen como los componentes de los alimentos que influyen en las actividades celulares y fisiológicas obteniendo, tras su ingesta, un efecto beneficioso para la salud. Normalmente, estos compuestos bioactivos están en cantidades muy pequeñas en los alimentos que consumimos como parte de nuestra dieta habitual y en casi todos los casos provienen de fuentes alimentarias vegetales. Desde el punto de vista químico estos compuestos son de origen diverso y actúan a través de mecanismos de acción diferentes. Así, existen carotenoides polifenoles, terpenos, lignanos, compuestos organosulfurados, glucosilatos, saponinas, etc. [16].

## **2.2. Marco Referencial.**

### **2.2.1. Cacao.**

Originario de zonas húmedas y templadas de la Costa la Amazonía, es un fruto tropical, proveniente de un árbol que produce una mazorca con semillas en su interior que están cubiertas de una sustancia blanquecina, azucarada y de olor agradable. La Organización Internacional del Cacao determinó que el Ecuador es el primer productor mundial de cacao fino de aroma por su dominancia y excepcional calidad en cuanto a características organolépticas satisfaciendo el 60 % de la demanda internacional requerida [2].

### **2.2.2. Cacao en Ecuador.**

La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional. Es un Cacao Fino de Aroma conocido como ‘Arriba’, desde la época colonial. Ecuador es el país con la mayor participación en este segmento del mercado mundial (un 63% de acuerdo con las estadísticas de ProEcuador). Otro dato muy importante es que, en el 2011, Ecuador recibió el premio como “mejor cacao por su calidad oral” y “mejor grano de cacao por región geográfica” en el Salón du Chocolat en París, Francia [17].

En los últimos años, el 80% de la producción se concentra en la cuenca del río Guayas por la fertilidad de los suelos, se encuentran 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 [11].

### **2.2.3. Variedades del cacao:**

#### **2.2.3.1. Cacao Nacional.**

Producto emblemático del Ecuador, llamado también cacao fino de aroma, su producción se concentra en mayor parte en las provincias de Guayas y Los Ríos, pertenecientes a la osta Pacífico ecuatoriano, este tipo de cacao se da gracias a las condiciones climáticas específicas que se dan en este territorio. Las mazorcas de cacao de esta variedad son de color verde, grandes, gruesas, de forma amelonada y ovalada, (Figura 2). Sus semillas dependiendo del

tamaño de la mazorca pueden ir de mediana a grande con colores que varían entre violeta y morado. Presenta un aroma distintivo a floral y frutal que le dan el nombre de fino de aroma, que actualmente está protegido por una denominación de origen.



*Figura 2. Cacao nacional.*

**Fuente:** *Anecacao (2015)*

### **2.2.3.2. Cacao CCN-51 de origen Trinitario**

En Ecuador se conoce al cacao CCN-51 como ramilla, este es un híbrido logrado de tres variedades genéticas: Trinitario, Nacional y Oriente 1; debido a esta combinación el clon de la colección Castro Naranjal (CCN-51) tiene una gran capacidad productiva comprobada dentro del territorio ecuatoriano y en el mundo. El fruto tiene generalmente una coloración roja (Figura 3) cuando se encuentra en desarrollo y maduración, con un aroma y sabor particularmente diferentes al fino de aroma. Sin embargo, este no es un cacao de menor calidad, por que presenta una mayor proporción de grasa que se aprovecha en la industria, y la cosmetología (propiedad de hidratar la piel) [18].



*Figura 3. Cacao CCN – 51.*

**Fuente:** *Anecacao (2015)*

### 2.2.3.3. Forasteros.

Presentan estaminodios de color violeta, las mazorcas son amarillas cuando están maduras, presentan surcos y rugosidad poco notables, son lisas y de extremos redondeados. La cáscara es algo gruesa y el mesocarpio lignificado, los granos son más o menos aplanados con cotiledones de color púrpura, de este tipo de cacao se obtiene un chocolate con sabor básico a cacao [19].



*Figura 4. Cacao Forastero.*

### 2.2.3.4. Trinitario.

Son de una población híbrida polimorfa donde se pueden observar todos los tipos intermedios de criollos por un lado y forastero por el otro, con lo cual se puede identificar una disyunción relevante en los descendientes de Trinitarios. Los trinitarios presentan diversas formas de mazorcas, hallándose de colores verdes y rojos cuando están inmaduras, tornándose en algunos casos anaranjadas y amarillas en la madurez. Generalmente presenta almendras de tamaño mediano a grande con cotiledones rojizos y desarrolla un aroma a chocolate pronunciado con un sabor adicional definido como frutal [19].



*Figura 5. Cacao Trinitario*

#### 2.2.4. Requerimientos edáficos del cacao.

En la Tabla 1, se muestran los requerimientos necesarios para la producción del cacao [5].

**Tabla 1.** *Requerimientos químicos y nutricionales del suelo para cultivos de cacao.*

<b>PROPIEDADES DEL SUELO</b>	<b>RANGO/VALOR</b>
Capacidad de intercambio catiónico	13
Saturación de bases	35% o más
pH	6 a 7
Fósforo	15 ppm o más
Potasio	0.24 mil-equivalentes o más
Calcio	8 mil-equivalentes o más
Magnesio	2 mil-equivalentes o más
Materia orgánica	3% a 5%

*Elaborado por: Aguirre Josselyn, 2022.*

#### 2.2.5. Post-cosecha del cacao.

Para el manejo Post-cosecha del cacao, se tienen en cuenta ciertos criterios de control y factores de calidad que deben llevarse a cabo para lograr la mayor calidad posible en el producto (grano) que se va a aprovechar, entonces esta etapa comienza con el quebrado o corte de la mazorca que debe realizarse con técnica para evitar el daño en las semillas, de las cuáles se separarán las almendras húmedas y sanas que pasarán a ser envasadas y transportadas al centro de acopio donde pasarán a ser analizadas una vez más antes de ser colocadas en cajas Rohan donde formarán una masa que se inoculará con hojas y se apilarán varias de estas para entrar en la etapa de fermentación que durará varios días dependiendo de la variedad, en el transcurso del cual se voltearán para desairar las cajas, al final de esto pasarán al secado el cual puede ser distinto según los requerimientos de la variedad o lo que disponga el productor, algunos de los cuales pueden ser secadora solar directa, secado en leña, secadora de planchas laminares, etc. Finalmente, las almendras de cacao son envasadas en sacos de yute, para su almacenamiento y posterior comercialización [20].

### **2.2.6. Cadena de producción del cacao en el Ecuador.**

En los últimos tres años Ecuador, se ha situado como el tercer productor mundial de cacao. Varios factores como el cambio climático, altas concentraciones de cadmio y la pandemia global del COVID-19 están influyendo en la cadena productiva del cacao ecuatoriano. El análisis de las características de la cadena productiva y de comercialización del cacao, los datos de producción y exportación, las características de los tipos de cacao, y productores muestran que Ecuador tiene una gran potencialidad para mantenerse en los estándares productivos.

El análisis de los factores que intervienen en la cadena del cacao ha permitido concluir que la resiliencia de la producción cacaotera ecuatoriana depende de la articulación de cinco acciones basadas en: (1) mejorar el entorno rural del productor, (2) fomentar la asociatividad y cooperativismo, (3) mejorar la productividad y el consumo del mercado nacional, (4) consolidar el mercado internacional, (5) e investigación orientada al mejoramiento [21].

### **2.2.7. Residuos de la cadena de beneficio del cacao.**

Actualmente la industria de la producción y procesamiento de cacao está centrada principalmente en el aprovechamiento de las almendras o semillas de este fruto, la cual es utilizada para la elaboración de productos tradicionales tales como polvo, licor y manteca, etc. El resto de partes del fruto (mazorca, mucílago y cascarilla), son desechados y/o utilizados como abono orgánico, creando una gran acumulación de desperdicios. Las semillas representan un 20 % del fruto aprovechado lo que significa que es un gran porcentaje (80 %) el que se pierde y no es utilizado con algún fin tecnológico o industrial. [22], [23].

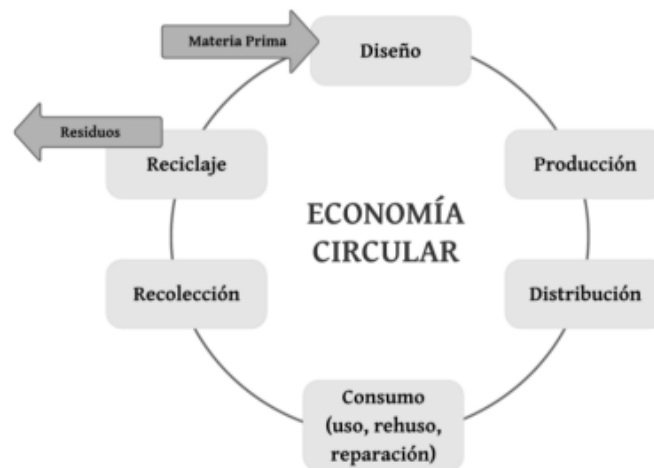
Tomando en cuenta los posibles defectos que puedan suscitar como la selección de mazorcas inmaduras cosechadas antes de tiempo. Tanto en las mazorcas que no han desarrollado por completo el mucilago, lo que altera el sabor y la calidad del chocolate, la manteca y otros subproductos elaborados con el grano, Las mazorcas sobre maduras tienden a germinar y no poseen mucilago para empezar a fermentar en condiciones que generen los sabores que aportan normalmente esta etapa [18].

### 2.2.8. Mazorca.

Es considerada un residuo resultante del proceso de producción agroindustrial del cacao. Este residuo se lo utiliza de abono para la misma siembra. La desventaja que este residuo produce en la siembra patógenos que afectan al cultivo [24].

### 2.2.9. Economía circular.

Es un nuevo modelo de consumo y producción que asegura el crecimiento sostenible de los negocios y empresas en el tiempo. Este permite optimizar los recursos, reducir el consumo de materias primas y reutilizar de manera eficaz los desechos; reciclándolos y dándoles un valor agregado, al transformarlos en productos nuevos. La economía circular tiene la finalidad de aprovechar en la mayor medida posible los recursos materiales que se disponen en el ciclo de vida de un producto y tiene inspiración en como la naturaleza reutiliza todo dentro de su propio ecosistema y lo convierte en algo de valor [25].



*Figura 6. Esquema del concepto economía circular.*

### 2.2.10. Valorización de residuos.

Actividad que consiste en otorgar un valor económico y funcional a los residuos que provienen del ciclo de beneficio de un producto generalmente agrícola, en materia cacaotera estos residuos son poco explotados. En estos días, el mucílago está empezando a tener mayor aprovechamiento según nuevos estudios, pero no es aprovechado ampliamente y no tiene un valor económico en el mercado. Los residuos son comprados como un total (mazorca), más

no son productos que tengan valor industrial y representen una ganancia para las empresas cacaoteras por lo que simplemente es desechado o dejado en las mismas fincas como abono orgánico. [23], [26].

Existe un potencial empleo de la biomasa residual del cacao tanto en su cáscara, cascarilla y lixiviados. La cáscara básicamente es una alternativa importante como fuente de fibra diaria para alimento animal y también como combustible sólido. Los lixiviados, ricos en azúcares pueden ser fermentados y convertidos en alcoholes. Estos desechos están constituidos básicamente por la cáscara del fruto y la pulpa de las semillas, los cuales son ricos en taninos, polifenoles, alcaloides, azúcares y polisacáridos [6].

### **2.2.11. Biorrefinería.**

En contraste con la refinería petroquímica convencional, la biorrefinería se trata de llevar a cabo procesos de manera eco-eficiente, que dejen un bajo impacto ambiental o una baja huella de carbono, y que sean alternativas eficientes y renovables que no compitan con las materias primas ya existentes sino más encaminadas a crear mercados nuevos de interés comercial [27].

La generación de subproductos en grandes volúmenes en las agroindustrias provoca problemas ambientales. Estos dos factores han desarrollado la biorrefinería como posible solución. La biorrefinería integrada con múltiples procesos y productos, juega un rol central en el desarrollo sustentable y en la bioeconomía. En Ecuador, la materia prima renovable lo constituyen la biomasa residual, es decir, los subproductos generados por la industria cervecera, aceitera, bananera, cacaotera, cafetera, arrocería, exportación de rosas, etc. tanto en el campo durante la cosecha como en la planta industrial durante su procesamiento. La biomasa residual contiene componentes químicos valiosos, que son potenciales fuentes de bioenergía, biomateriales y bioproductos. Para dejar de exportar materias primas y exportar productos de alto valor agregado, es necesaria la investigación y desarrollo de nuevos procesos y productos [28].

### **2.2.12. Biocompuestos.**

Son sustancias encontradas en los alimentos que determinan como se dirigen las actividades celulares y fisiológicas del organismo luego de su ingesta, que aportan un efecto beneficioso en la salud humana y animal [16].

### **2.2.13. Polifenoles.**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, con varias funciones fisiológicas, caracterizando diferentes estructuras químicas a este grupo de moléculas. Los extractos naturales ricos en compuestos fenólicos perfilan como ingredientes bioactivos, debido a su capacidad de captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno asociadas con el padecimiento de enfermedades, pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos en la industria farmacéutica, de alimentos y cosméticos. Su importancia biológica radica en que estos fitonutrientes participan en diversas funciones fisiológicas, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis y la formación de componentes estructurales [29].

Las plantas sintetizan miles de Compuestos fenólicos diferentes, en el reino vegetal se encuentran ampliamente distribuidos. Debido a sus diversas funciones son objeto habitual de investigación como lo es la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente como la agresión por patógenos e insectos. Las cáscaras de cacao son ricas en carbohidratos, fibra, proteínas, pectina y compuestos bioactivos (polifenoles y carotenoides). En el cacao, los polifenoles de interés son el grupo de flavonoides como las catequinas (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%). Se destacan por su baja toxicidad, mayor actividad antioxidante y capacidad de inhibir la peroxidación lipídica al reducir radicales libres y quelar metales, Tiene en su estructura química al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y frecuentemente se encuentran como derivados de esteres, éteres y glucósidos [30], [31].

### **2.2.14. Flavonoides.**

Los flavonoides son la clase más abundante de PF, derivados de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina. Son necesarios para el desarrollo de vegetales, debido a su bajo peso molecular ya que pueden actuar como señaladores químicos y tiene efectos sobre algunas enzimas ligadas a la fisiología y metabolismo del vegetal. Son compuestos con propiedades asociadas a una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares en los seres humanos. Debido a que estos son antioxidantes poderosos con características antiinflamatorias que asisten al sistema inmunológico. Responsables de los intensos colores de las frutas y verduras, los flavonoides son un grupo diverso de fitonutrientes (químicos

vegetales) que se encuentran en muchas frutas, verduras y especias [30], [32].

Los flavonoides desempeñan funciones como agentes para repeler insectos y ciertos microorganismos, absorben radicales libres y luz UV-vis, en la atracción de simbioses y polinizadores benéficos. Están formados por 15 átomos de carbono en configuración base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> con una estructura de dos anillos aromáticos, unidos por un puente de 3 carbonos en forma de un anillo heterocíclico (C), generalmente con presencia de un átomo de oxígeno [33].

### **2.2.15. Carotenoides.**

Los carotenoides, son compuestos responsables del atractivo color de muchas frutas y verduras, responsables de los colores rojo, amarillo y naranja, generando una amplia gama de colores. Forman una amplia familia de pigmentos naturales sintetizados por todas las plantas. Ayudan a captar la energía luminosa y actúan como antioxidantes debido a las funciones esenciales que desempeñan en las plantas. Son capaces de inactivar especies reactivas de oxígeno que se producen en las células, por su poder de antioxidante, protegiéndolas de estas moléculas dañinas [34].

Poseen funciones importantes en la fotosíntesis y actúan como defensa en los tejidos vegetales. Tiene la capacidad de funcionar como precursor de la vitamina A en la dieta humana. Los carotenoides totales pueden ser afectados debido al estadio de madurez, la genética y factores ambientales a mayor exposición de la luz aumenta la concentración de carotenoides, durante la maduración aumenta el contenido de carotenoides totales debido a la pérdida de clorofila [35], [36].

### **2.2.16. Antocianinas.**

Las antocianinas son comúnmente sintetizadas por las plantas y son las responsables, de los colores rojo, naranja, azul y púrpura de muchas flores, frutas y verduras, bajo diferentes condiciones de pH, Son pigmentos solubles en agua perteneciente a la familia de los flavonoides (compuestos fenólicos). Es de gran importancia la presencia de antocianinas en diversas partes de la planta, ya que juegan un papel importante en la ecofisiología y en la propagación de plantas; participan en los mecanismos de defensa de las plantas contra factores de estrés bióticos, ambientales y ayudan a atraer polinizadores. Las antocianinas y sus derivados son antioxidantes, anticancerígenos, generando un efecto protector en la

prevención de procesos degenerativos de enfermedades cancerígenas y tienen potencial para prevenir la pérdida de memoria y enfermedades neurodegenerativas [37].

Actualmente se conocen aproximadamente 20 diferentes antocianinas, entre las cuáles, las más importantes son la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peoidina y malvidina; pueden ser combinadas con diferentes azúcares y formar alrededor de 150 tipos de antocianinas. La arabinosa, xilosa y glucosa, son los monosacáridos más comunes presentes en las antocianinas. Mientras que, los disacáridos más comunes son la sambubiosa y rutinosa, la estabilidad de las antocianinas depende de diferentes factores como su estructura, el pH, temperatura, longitud de onda y oxígeno [38].

### **2.2.17. Antioxidantes.**

Los antioxidantes son sustancias que el organismo sintetiza de forma natural o que se encuentran en los alimentos. Debido a que terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, provocándose la auto oxidación de estos compuestos, que a menudo son considerados como agentes reductores tales como tioles o polifenoles. Los compuestos antioxidantes poseen una estructura química apropiada para reaccionar fácilmente con un radical libre y como resultado de dicha interacción, estos últimos pierden su reactividad y los antioxidantes se oxidan convirtiéndose en moléculas notablemente “más estables” hacia su entorno. Los antioxidantes contrarrestan los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno, capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, y ayudan a prevenir o retardar la progresión de muchas enfermedades no transmisibles que afectan a los seres humanos [39], [40].

### **2.2.18. Oxidación.**

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia hacia un agente oxidante, evadiendo la iniciación o propagación de reacciones en cadena, de los radicales libres que dañan las células del cuerpo humano [39], [40].

### **2.2.19. Sistema antioxidante naturales.**

Los órganos y células del cuerpo tienen sistemas antioxidantes, los cuales pueden ser enzimáticos, no enzimáticos o proteínas de unión, actuando sinérgicamente para neutralizar las diferentes especies reactivas del oxígeno, formando una red de antioxidantes [12].

Para evitar la oxidación de las proteínas, los lípidos y el ADN, los antioxidantes captan el electrón desapareado del orbital externo de los radicales libres y de esta forma los desactiva, disminuyen el estrés oxidativo y actúan sobre el mismo inhibiéndolo. Las alteraciones en estas biomoléculas como consecuencia del estrés oxidativo producirán el desarrollo de patologías siendo las más relevantes diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson y Alzheimer, o incluso cáncer [41].

### **2.2.20. Actividad antioxidante.**

La cantidad de antioxidantes presentes en un sistema, o la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes en el cuerpo humano, es la determinación de la capacidad antioxidante útil para valorar la calidad de un alimento [42].

En las últimas tres décadas, se han multiplicado exponencialmente los reportes que atribuyen a los compuestos fenólicos incorporados en la dieta, efectos benéficos para la salud humana y animal, bien como antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorios y antiaterosclerosis. La estructura polifenólica de flavonoides, por ejemplo, resulta ideal para la actividad secuestrante de radicales libres, además han demostrado ser varias veces más eficaces como antioxidantes que por ejemplo las vitaminas E y C (40), empleados convencionalmente como los más potentes antioxidantes naturales.

Por otra parte, los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal. Su contribución a la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida, por ejemplo, las antocianidinas, son responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de muchos frutos clasificados incluso como “superfrutos” por su notable actividad antioxidante y que, en cacao se ha demostrado el contenido de polifenoles y potencial antioxidante es superior. Así también, los compuestos fenólicos, particularmente los taninos condensados o proantocianidinas se asocian con la astringencia que presentan muchos frutos, como lo es el cacao al momento de ser cosechado [43].

### **2.2.21. Radicales libres.**

Debido a que un radical libre es un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados, esto son inestables y extremadamente reactivos, ya que rápidamente extraen electrones de las moléculas cercanas para completar el número de electrones de su orbital

más externo (capa de valencia), la mayoría de los elementos importantes en la biología necesitan ocho electrones en su capa externa para ser estables y esta regla se conoce como regla del octeto. Cuando el radical consigue sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células.

Los radicales libres siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común, que se pueden formar a partir de diversos mecanismos, una vez que estos son formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable, razón por la cual interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox) [44].

## **2.2.22. Cuantificación de la actividad antioxidante.**

### **2.2.22.1. Método ABTS<sup>+</sup>.**

Este método se basa en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS<sup>+</sup>, debido a su reducción a ABTS por la acción de antioxidantes. El radical catiónico ABTS<sup>+</sup> es un cromóforo verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm, generando por una reacción de oxidación del ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical ABTS<sup>+</sup> es determinado en función a la concentración [45].

### **2.2.22.2. Método FRAP.**

El análisis de FRAP se fundamenta en la capacidad de los polifenoles para reducir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, formando un complejo azul leído a una absorción alta a una longitud de onda de 716 nm. El color azul resultante de esta reacción se determina por la cantidad de hierro reducido y puede correlacionarse con la actividad antioxidante de la muestra en estudio [40]. El método FRAP se fundamenta en la reducción del hierro férrico (Fe<sup>3+</sup>) presente en el reactivo de FRAP hasta la forma ferrosa (Fe<sup>2+</sup>) por presencia de antioxidantes. Se forma una coloración azul, de intensa proporcionalidad a la capacidad reductora de la muestra (se genera un complejo ferroso-TPTZ) que puede cuantificarse por colorimetría (593nm) en base a un patrón de sulfato ferroso [45], [46].

## **CAPÍTULO III**

# **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1. Localización.

**Tabla 2.** *Localización del trabajo experimental.*

<b>Investigación</b>	<b>Localización</b>
Preparación de la muestra	Las mazorcas de cacao se tomaron muestras de la Asociación de Agricultores “La Cruz”, ubicado en el cantón Mocache (Km 7 <sup>1/2</sup> , vía Mocache - Jauneche), provincia de Los Ríos
Análisis físicoquímico y antioxidantes	Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Mejía, Pichincha.

**Elaborado por:** *Aguirre Josselyn, 2022.*

#### **Recolección de muestras.**

De cada fruto (mazorca) cosechada se extrajo los granos de 15 a 20 aproximadamente los cuáles pasaron a fases de fermentación y secado para desarrollar las características requeridas para ser comercializados, durante esta etapa de separación de los componentes del fruto se obtuvo la parte externa más gruesa denominada mazorca la cuál fue empacada cuidadosamente para ser llevada a preparación y posterior análisis [47].

#### **Preparación de las muestras.**

Las muestras de mazorca fueron almacenadas en recipientes herméticos y congelados a -18°C para luego ser liofilizados a -80°C. Las dos muestras se aislaron de la luz y el oxígeno, para su conservación y posterior caracterización funcional (antioxidante totales y actividad antioxidante) [47].

### 3.2. Tipos de investigación.

Para la realización del proyecto se aplicó investigación exploratoria y cuantitativa, ya que no existen muchos análisis sobre la reutilización de estos residuos del cacao para darles un valor agregado.

### **3.2.1. Investigación Exploratoria.**

La investigación exploratoria es utilizada para el estudio de un problema con el objetivo de conseguir una información donde haya una mejor comprensión mejor, sin facilitar resultados concluyentes.

### **3.2.2. Investigación experimental.**

Con este tipo de investigación se evaluó la actividad antioxidante de mazorca de cacao de la variedad clon CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario, mediante los métodos ABTS<sup>+</sup>, FRAP.

## **3.3. Método de investigación.**

### **3.3.1. Método inductivo – deductivo.**

En la realización del proyecto de investigación se utilizó el método inductivo-deductivo seguido del problema que es la escasa economía circular aplicada en estos residuos del cacao. Este método llevo a cabo como solucionar el aprovechamiento de los residuos y compuestos bioactivos presentes en la mazorca de cacao.

### **3.3.2. Métodos estadísticos.**

Para los estudios estadísticos de los resultados se empleó un software libre, por el cual se realizó el cotejo de los datos obtenidos en el laboratorio.

## **3.4. Fuentes de recopilación de información.**

Para el progreso de este proyecto de investigación se utilizó fuentes de recopilación de tipo primarias y secundarias.

### **3.4.1. Fuentes primarias.**

Esta fuente de información que se ejecutaron para el desarrollo de este proyecto de investigación estuvo compuesta por trabajo de campo y análisis de laboratorio mediante:

- Caracterización de compuestos bioactivos.

- Caracterizar estos residuos y darle valor agregado.
- Análisis fisicoquímico y funcional.

### 3.4.2. Fuentes secundarias.

Estas fuentes secundarias para la selección de información ejecutadas en el marco conceptual, referencial y la metodología se las extrajo de varias fuentes de bibliografía tales como:

- Artículos de revista
- Libros
- Repositorios
- Trabajos de tesis
- Artículos científicos

### 3.5. Diseño de la investigación.

En el presente trabajo de investigación se ejecutó la prueba “t” de Student con la finalidad de evaluar el efecto de la variedad sobre el contenido de antioxidantes totales (antocianinas, carotenoides, polifenoles, flavonoides) y la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS<sup>+</sup> y FRAP. Para el estudio se planteó las siguientes hipótesis experimentales:

- **H<sub>0</sub>:**  $\mu_1 = \mu_2$  H<sub>0</sub>: No existe un efecto de la variedad (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de antioxidantes totales y la actividad antioxidante de mazorca de cacao.
- **H<sub>1</sub>:**  $\mu_1 \neq \mu_2$  H<sub>1</sub>: Existe un efecto de la variedad (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de antioxidantes totales y la actividad antioxidante de mazorca de cacao.

El análisis estadístico de los resultados se consideró un nivel de confianza de 95% ( $\alpha = 0,05$ ), empleando la siguiente combinación de tratamientos. (Tabla 3).

**Tabla 3.** *Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao.*

<b>Réplicas</b>	<b>Cacao clon CCN-51</b>	<b>Cacao complejo NacionalxTrinitario</b>
<b>1</b>	$Y_{10}$	$Y_{20}$
<b>2</b>	$Y_{11}$	$Y_{21}$
<b>3</b>	$Y_{12}$	$Y_{22}$

**Elaborado por:** *Aguirre Josselyn, 2022.*

La evaluación estadística de los antioxidantes totales (antocianinas, carotenoides polifenoles, flavonoides) y actividad antioxidante (ABTS<sup>+</sup>, FRAP) de mazorca de cacao se realizó siguiendo el mismo tratamiento estadístico de los datos para todos los parámetros mencionados, de forma independiente.

### **3.5.1. Esquema del análisis de varianza.**

Para el desarrollo del trabajo de titulación se trabajó con una prueba de comparación de muestras emparejadas mediante el estadístico “t” de Student.

En la Tabla 4 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 el contenido de antioxidantes y la actividad antioxidante de las muestras de mazorca en estudio.

**Tabla 4.** Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de actividad antioxidante en mazorca de cacao.

Parámetros	RESIDUOS	
	Cacao clon CCN-51	Cacao complejo NacionalxTrinitario
Media	$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^n X_l}{n}$	$\bar{X} = \frac{\sum_{l=1}^n X_l}{n}$
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	$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{Sd/\sqrt{n}}$	$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{Sd/\sqrt{n}}$
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: Aguirre Josselyn, 2022.

### 3.5.2. Análisis de correlación de Pearson.

Para identificar los compuestos antioxidantes responsables de la capacidad antioxidantes de las muestras de mazorca de cacao, se ejecutó un análisis de correlación de Pearson (Tabla 5). A través del coeficiente de correlación de Pearson se identificó el grado de correlación que existe entre antocianinas, carotenoides, polifenoles y flavonoides totales, con la actividad antioxidante in vitro de las muestras de mazorca estudiadas de forma independiente.

**Tabla 5** - Matriz de correlación para relacionar el contenido de antioxidantes totales (polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas) y actividad antioxidante en residuos de cacao.

CAPACIDAD	CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS			
	Antocianinas	Carotenoides	Polifenoles	Flavonoides
ABTS <sup>+</sup>	$r_{va}$	$r_{vb}$	$r_{vc}$	$r_{vd}$
FRAP	$r_{xa}$	$r_{xb}$	$r_{xc}$	$r_{xd}$

$v = \text{ABTS}^+$ ,  $x = \text{FRAP}$ ;  $a = \text{Antocianinas}$ ,  $b = \text{Carotenoides}$ ,  $c = \text{Polifenoles}$ ,  $d = \text{Flavonoides}$ .

ABTS<sup>+</sup> (decoloración del catión radical ABTS<sup>+</sup>).

FRAP (poder antioxidante reductor férrica).

Elaborado por: Aguirre Josselyn, 2022.

### 3.6. Instrumentos de investigación.

#### 3.6.1. Variables a evaluar

#### 3.6.2. Variables independientes.

- Clon CCN-51(Mazorca)
- Cacao complejo NacionalxTrinitario (Mazorca)

#### 3.6.3. Variables dependientes.

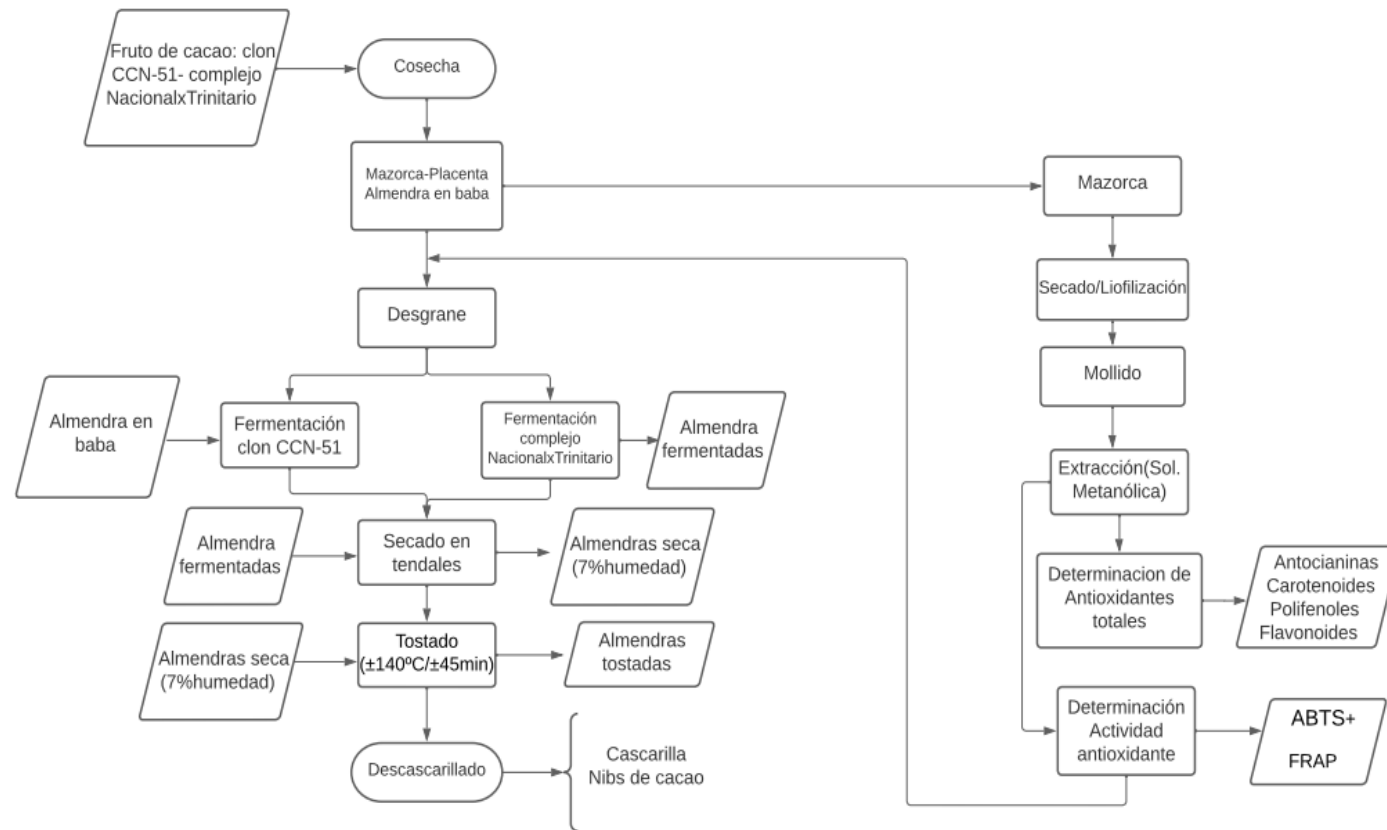
##### Contenido de antioxidantes totales

- Antocianinas – Colorimetría
- Carotenoides - Colorimetría
- Polifenoles – Folin - Ciolcateu
- Flavonoides - Colorimetría

##### Actividad antioxidante in vitro

- ABTS<sup>+</sup> - captación de radicales catiónicos
- FRAP - radicales férricos o metálicos

## Diagrama de procedimiento experimental



**Figura 7.** Diagrama de procedimiento experimental de la mazorca.

*Elaborado por:* Aguirre Josselyn, 2022.

### **3.7. Extracción de compuestos bioactivos.**

Para la extracción de los componentes fenólicos se pesaron 0,3 g de residuo de cacao (mazorca) 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 se centrifugó 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. La disolución obtenida se empleó para la cuantificación de la capacidad antioxidante por los 2 métodos propuestos [47].

#### **3.7.1. Antioxidantes totales.**

##### *Contenido total de antocianinas (TAC)*

La determinación del contenido de antocianinas totales (TAC) se realizó siguiendo el método descrito por [48]. La muestra liofilizada de mazorca de cacao se realizó mediante pesaje. Entonces, a un pH de 1.0 solución tampón (HCl 0,2 N y NaCl 0,2 N) para llevar a cabo la extracción. La mezcla se agitó en un vórtice (Multi-Mixers; Illinois, Estados Unidos), llevada a un baño ultrasónico (Cole-Parmer 8892-MTH; Illinois, Estados Unidos), y centrifugada. Se utilizó el mismo procedimiento considerando que el tampón de pH 4.5 (CH<sub>3</sub>COONa 1M y HCl 0,1 M). Finalmente, el extracto se pasó a un vaso celda para leer la absorbancia a 510 y 700 nm, respectivamente, en un Espectrofotómetro Shimadzu UV-vis 2.600 (Kyoto, Japón). El TAC fue calculado por diferencias de absorbancia de pH 1.0 menos pH 4.5, como descrito abajo: El método fue validado mediante la realización de una serie de extracciones determinar la precisión del método con cuatro repeticiones para mazorca de cacao y por exactitud se realizaron diferentes ciclos de extracción para obtener el 100% del contenido del componente bioactivo de la muestra.

##### *Contenido total de carotenoides (TCC)*

La determinación del contenido de carotenoides totales (TCC) se realizó siguiendo el método descrito por [48]. La muestra liofilizada de mazorca de cacao se inició pesando un gramo de

calcio cloruro y una solución de hexano, acetona, etanol y BHT en proporción 50:25:25:0.1 (v: v: v: v), para realizar la extracción. La mezcla se agitó en un vórtice (Mistral 4600, Multi-Mixers; Illinois, Estados Unidos), y centrifugado. Finalmente, el extracto se pasó a una celda de vidrio para leer la absorbancia a 490 nm en un Shimadzu UV-vis Espectrofotómetro 2600 (Kyoto, Japón). El método se validó realizando una serie de extracciones para determinar la precisión del método con seis repeticiones y para la precisión, se realizaron diferentes ciclos de extracción para obtener 100% del contenido del componente bioactivo de la muestra.

#### ***Contenido total de polifenoles (TPC)***

La TPC se determinó siguiendo el método descrito por [48]. La muestra liofilizada fue disuelta en metanol: agua: ácido fórmico (70:30:0,1 v: v: v). La muestra se mezcló usando Vortex Mistral 4600 (Multi-Mixers; Illinois, EE. UU). Luego, la muestra se sometió a un baño ultrasónico Cole Parmer 8892-MTH (Cole-Parmer, Illinois, EE. UU.) y luego se centrifugó. Una parte de la muestra se mezcló con el reactivo Folin-Ciocalteu y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-vis 2600 Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 760 nm. Se usó ácido gálico como estándar (0 a 100 ppm) para viaje licado en tres días ( $n = 9$ ). Se estableció la curva de calibración ( $y = 0.0116x + 0.0693$ ,  $R^2 = 0.9999$ ). TPC se expresó en términos de mg de equivalentes de ácido gálico GAE/100g de muestra de peso seco (PS).

#### ***Contenido total de Flavonoides (TFC)***

El contenido de flavonoides totales (CFT). La muestra se disolvió en metanol: agua: ácido fórmico (70:30: 0.1, v: v: v). Una alícuota del sobrenadante se hizo reaccionar con sodio nitrato, cloruro de aluminio e hidróxido de sodio. La absorbancia de la mezcla se midió con la ayuda de un Shimadzu UV-vis Espectrofotómetro 2600 (Shimadzu, Kioto, Japón) a 490 nm. Los la absorbancia se midió a 430 nm. TFC se determinó utilizando una curva de calibración de quercetina ( $y = 0,0036x + 0,0637$ ,  $R^2 = 0,9994$ ) por triplicado durante 3 días ( $n = 9$ ). Los resultados se expresaron en mg quercetina/100g peso seco (PS) [48].

### **3.7.2. Actividad antioxidante.**

#### ***a) Actividad antioxidante ABTS<sup>+</sup>***

La capacidad antioxidante se determinó por el método del ABTS<sup>+</sup> de acuerdo al proceso

descrito por [49], con algunas modificaciones. La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV-vis a 734 nm, utilizando una curva estándar de Trolox (0-800  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los resultados se expresan como  $\mu\text{M}$  de Trolox equivalentes ( $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de muestra seca.

#### ***b) Actividad antioxidante FRAP***

La capacidad antioxidante por FRAP se determinó siguiendo el método propuesto por [50]. 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  $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes ( $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de muestra seca.

### **3.8. Recursos Humanos y Materiales.**

#### **3.8.1. Recursos Humanos.**

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

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

#### **3.8.2. Materiales.**

##### ***Materia prima.***

- Mazorca de cacao clon CCN-51
- Mazorca de cacao complejo NacionalxTrinitario

##### ***Materiales de laboratorio.***

- Vasos de precipitación de 50, 100,250, 500 y 1000 mL
- Tubos de ensayo
- Balones de aforo de 25, 50, 100, 250y 500 mL
- Probetas de 10, 250, 500 y 1000 mL
- Tubos de centrífuga de 15 y 50 mL
- Espátula

- Termómetro
- Micropipetas 100-1000  $\mu\text{L}$  y 1-10 mL
- Puntas para micropipeta 100-1000  $\mu\text{L}$  y 1-10 mL
- Pissetas
- Gradillas
- Frascos de vidrio color ámbar.
- Microplacas negras

***Reactivos.***

- Ácido fórmico (pureza 99 %)
- Ácido gálico estándar (pureza 98 %)
- Etanol (grado analítico 99,9 %)
- Hexano (ACS, 98 %)
- Metanol grado analítico (98 %)
- Acetato de potasio (pureza 99 %)
- Hidróxido de sodio (pureza 99 %)
- Agua destilada
- Agua bidestilada
- ABTS<sup>+</sup>
- Fosfato de sodio monobásico
- Fosfato de sodio dibásico
- Persulfato de potasio
- Trolox
- Ferrocianida de potasio
- Ácido tricloroacético (10%)
- Cloruro férrico (1%)

***Equipos.***

- Congelador, Balanza analítica
- Estufa de secado, Baño ultrasónico
- Baño María, Centrífuga
- Espectrofotómetro UV-vis
- Vortex,
- Multimixer

## **CAPÍTULO IV**

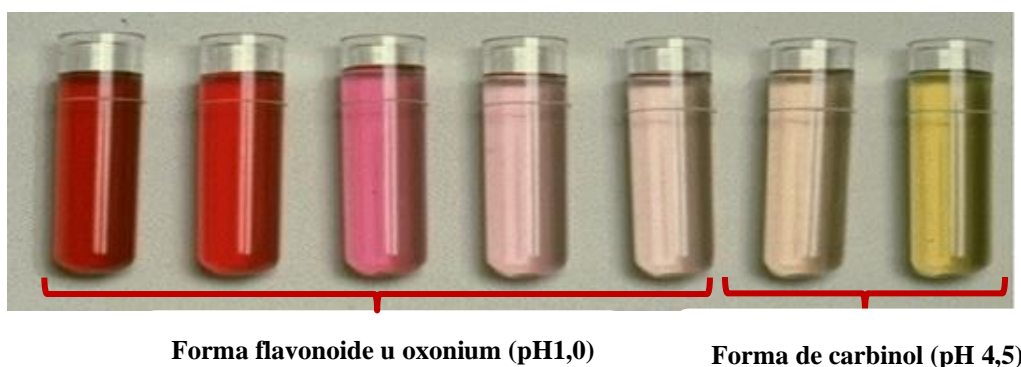
### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados y Discusión

### 4.1.1. Antioxidantes totales.

#### 4.1.1.1. Antocianinas totales.

De acuerdo con el método desarrollado por Rapisarda [51], las antocianinas son pigmentos responsables del color de la pulpa, corteza, flores, hojas y otras partes de las plantas. Según estos autores, este tipo de compuestos pueden sufrir transformaciones estructurales a nivel químico, por efecto del pH. Cuando se encuentran a pH extremadamente ácido (pH=1,0) los antocianos muestran una alta coloración de oxonium en su forma flavonoide; mientras que a pH 4,5 presentaran una forma predominante de carbinol menos coloreado, como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Transformación estructural y cambio de coloración de las antocianinas por efecto del pH.

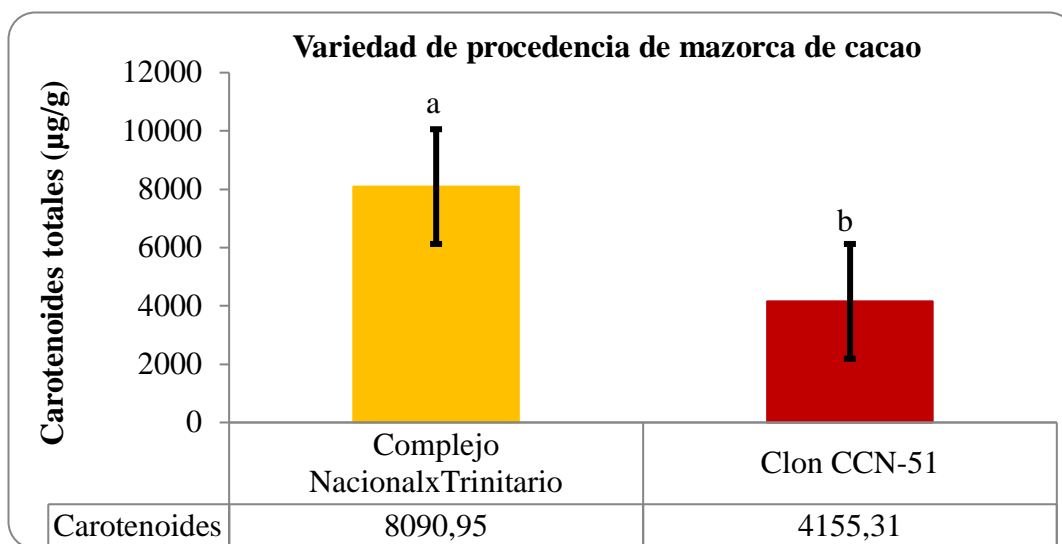
En el análisis cuantitativo realizado en esta investigación mediante espectrofotometría UV-vis, se empleó dos soluciones buffer con la finalidad de minimizar la interferencia provocada por los fenómenos químicos citados anteriormente. Sin embargo, se determinó que existe un desequilibrio entre las formas coloreadas e incoloras de las antocianinas en las muestras de mazorca de cacao provenientes del clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario. Las muestras presentaron una concentración de iones de hidrógeno inferior en pH 1,0 por lo que el cambio al catión flavilio rojo ( $F^+$ ) en medio muy ácido fue menor que la forma de sal de flavilio almacenado en el cromenol incoloro (FOH).

Por lo tanto, se puede determinar que los residuos de cacao como la mazorca carece de compuestos antociánicos y su color puede depender de la copigmentación de las muestras con diferentes sustancias polifenólicas que pueden afectar el tono y la intensidad del color de las mismas.

A pesar de que se observó valores de absorción UV-vis a 510 y 700 nm del extracto de mazorca estudiados, estos fueron muy bajos y podrían indicar que las concentraciones medidas se encuentran por debajo del límite de detección del equipo utilizado.

#### 4.1.1.2. Carotenoides totales.

En la Figura 9, se muestran los resultados de la concentración de carotenoides totales medidos en muestras de mazorca de cacao de complejo NacionalxTrinitario y clon CCN-51.



**Figura 9.** Contenido de carotenoides totales en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 9, se estableció que las muestras de mazorca de cacao de la variedad complejo NacionalxTrinitario (8090,25 µg/g) presentaron un mayor contenido de carotenoides totales (TCC) que las muestras de la variedad clon CCN-51 (4155,31 µg/g). Los resultados presentados en la Tabla 6, demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos muestras de mazorca de cacao estudiadas; evidenciándose que existe un efecto de la variedad de cacao en contenido de carotenoides totales. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ), con un valor de  $t_{\text{student calculado}}$  superior (11,34915805) al valor de  $t_{\text{crítico}}$  (6,313751515).

**Tabla 6.** Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de Carotenoides Totales.

<b>PARÁMETRO ESTADÍSTICO</b>	<b>Cacao complejo NacionalxTrinitario</b>	<b>Cacao Clon CCN-51</b>
Media	8090,94884	4155,313491
Varianza	35682,25821	90914,49037
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	11,34915805	S
P(T<=t) una cola	0,027974757	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,055949514	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Los valores presentados en la muestra de estudio (Figura 9), fueron superiores a los resultados reportados por Murillo y colaboradores [52]; quien obtuvo concentraciones de carotenoides totales entre 1,43 y 1,25 mg•g<sup>-1</sup>(1430-1250 µg/g) . Debido a que existe un efecto de la zona de procedencia del cultivo y en el tipo de variedad de mazorcas de cacao puesto que fueron muestras de la variedad, criollo de color amarillo verdoso y el Híbrido CCN-51 de color rojo anaranjado intenso, mediante un secador de cabina en base seca del distrito de Pichanaki (Chanchamayo Junín, selva central del Perú).

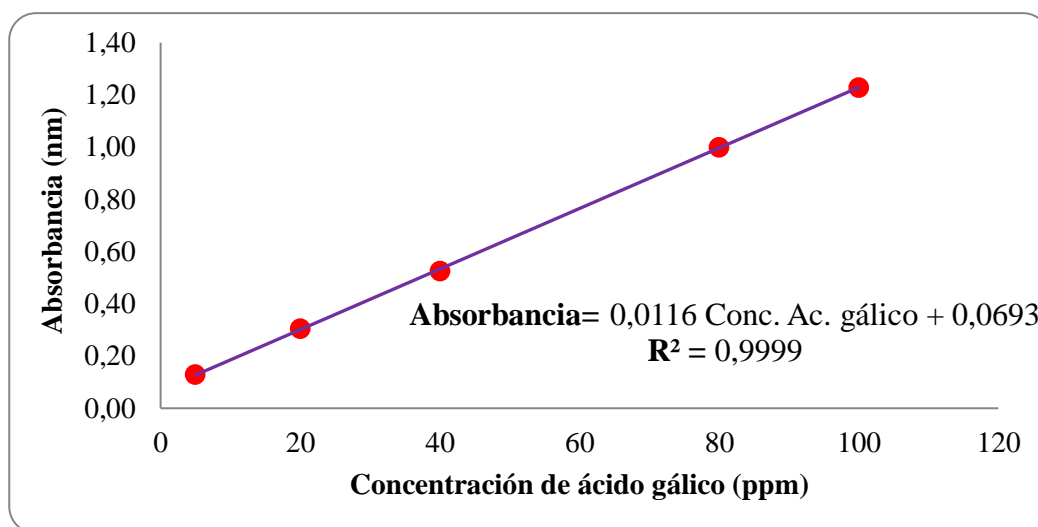
Según Pérez se encontró una mayor concentración de carotenoides totales en muestras secadas en estufa con sistema de recirculación de aire; presentando valores de 44,95 mg•g<sup>-1</sup> en cacao de la variedad clon CCN-51, procedente de La Victoria (Rionegro); Villa Mónica (San Vicente de Chucurí)[53]. Por el contenido de actividad antioxidante se infiere que podría tener efectos benéficos para la salud similares a ciertas frutas, vegetales, plantas, vinos, y su posible uso como materia prima para la obtención de antioxidantes naturales de gran utilidad en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética [54].

El contenido de carotenoides en ambas muestras son cantidades importantes considerando que el ser humano no puede sintetizar carotenoides, por lo tanto, depende de la dieta alimentaria para obtener niveles suficientes de los mismos, estos autores indican que las frutas y verduras son la fuente primaria de carotenoides en la dieta humana y su composición

ha sido asociada con beneficios a la salud y poseen una importante capacidad antioxidante ya que interaccionan con el oxígeno [35], [36].

#### 4.1.1.3. Polifenoles totales.

Para la determinación del contenido de polifenoles totales por el método de la curva patrón se validó la recta de calibrado, empleando ácido gálico como estándar. La curva se preparó por triplicado durante tres días, presentando una curva promedio como se presenta en la Figura 10.



*Figura 10. Curva de calibración de polifenoles totales.*

Los resultados presentados en la Figura 10, demuestran que existe una alta correlación ( $R^2=0,9999$ ) entre la concentración del estándar de ácido gálico y la absorbancia medida por espectrofotometría UV-vis, permitiendo cuantificar con exactitud y precisión el contenido de polifenoles totales en las muestras de mazorca de cacao.

#### **Validación de la curva patrón**

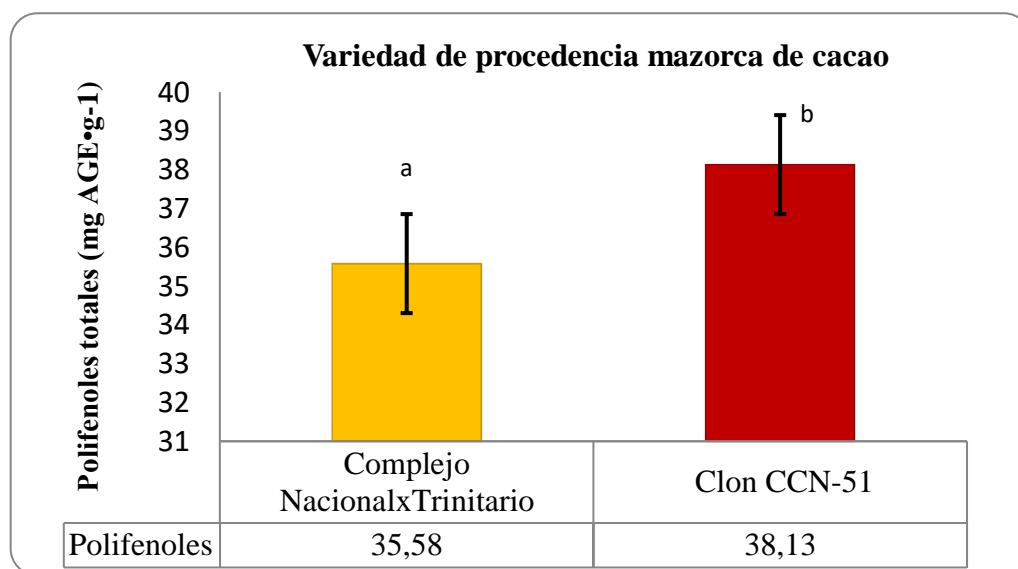
Para la determinación de polifenoles totales mediante el método de curva patrón se validó la recta de calibrado como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Validación de la curva de calibración de ácido gálico para el método de determinación de polifenoles totales.

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	GLOBAL
<b>m (pendiente)</b>	0,0130	0,0119	0,0098	0,0116
<b>Lo (ordenada al origen)</b>	0,0724	0,0695	0,0659	0,0693
<b>Sy, x (error típico)</b>	0,0152	0,0074	0,0010	0,0079
<b>sm (Desv st pendiente)</b>	0,0002	0,0001	0,0000	0,0001
<b>SLo (Desv. St ordenada)</b>	0,0115	0,0056	0,0008	0,0060
<b>t (student)</b>	3,1824	3,1824	3,1824	3,1824
<b>m(min)</b>	0,0124	0,0116	0,0098	0,0113
<b>m(máx)</b>	0,0136	0,0122	0,0099	0,0119
<b>Lo (min)</b>	0,0357	0,0515	0,0635	0,0503
<b>Lo (máx)</b>	0,1090	0,0874	0,0684	0,0883

Los resultados presentados en la Tabla 7. corresponden a los valores de las curvas de calibración representativas de tres ensayos realizados, durante tres días. Con el fin de obtener siempre la linealidad de la curva se promediaron las pendientes. El valor de la pendiente fue  $0,0116 \pm 0,0001$  y el valor de la ordenada al origen fue de  $0,0693 \pm 0,0060$ .

En la Figura 11, se muestran los resultados de la concentración de polifenoles totales medidos en muestras de mazorca de cacao de complejo NacionalxTrinitario y clon CCN-51.



**Figura 11.** Contenido de polifenoles totales en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 11, se estableció que las muestras de mazorca de cacao de la variedad clon CCN-51 (38.13 mg AGE•g<sup>-1</sup>) presentaron un mayor contenido de polifenoles totales (TPC) que las muestras de la variedad complejo NacionalxTrinitario (35.58 mg AGE•g<sup>-1</sup>). Los resultados presentados en la Tabla 8, demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las dos muestras de mazorca de cacao estudiadas; evidenciándose que no existe un efecto de la variedad de cacao en contenido de polifenoles totales. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H<sub>0</sub>), con un valor de  $t_{\text{student calculado}}$  inferior (-3,286432238) al valor de  $t_{\text{crítico}}$  (6,313751515).

**Tabla 8.** Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de Polifenoles Totales.

<b>PARÁMETRO ESTADÍSTICO</b>	<b>Cacao complejo NacionalxTrinitario</b>	<b>Cacao Clon CCN-51</b>
Media	35,57919634	38,13108583
Varianza	0,957118048	0,014352498
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-3,286432238	NS
P(T≤t) una cola	0,094022369	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T≤t) dos colas	0,188044739	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Los valores presentados en la Figura 11, se encuentran dentro del rango reportado por Murillo y colaboradores [52], Mora y colaboradores [55] y Martínez [56] quienes obtuvieron concentraciones de polifenoles totales entre 2,02 y 365,33 mg AGE•g<sup>-1</sup>. Según estos autores, las diferencias encontradas se deben a que existe un efecto de la variedad, la zona de producción, la época de cosecha, el manejo agronómico y el contenido de compuestos fenólicos en almendras de cacao[57]. Considerándose que estos metabolitos se acumulan en todas las partes de la planta de *Theobroma cacao* L. podríamos establecer que en los residuos de la cadena de beneficio del cacao (mazorca) se mantiene el mismo comportamiento.

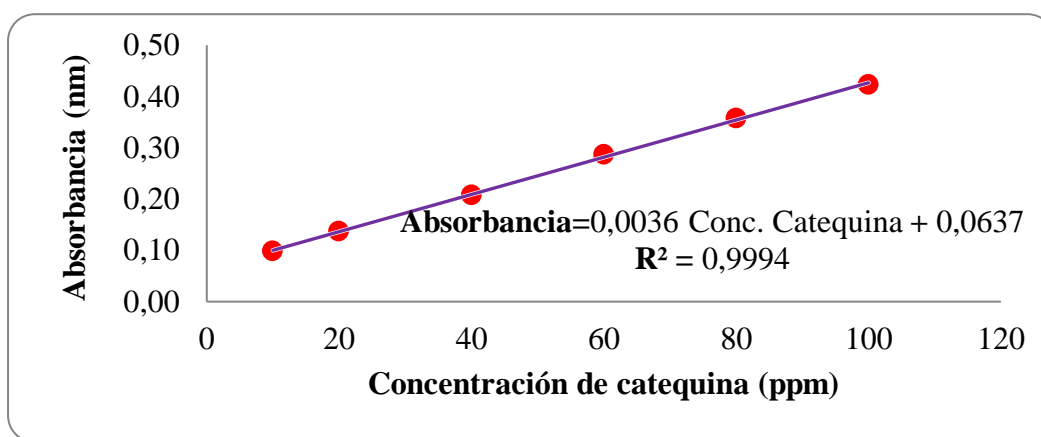
En mazorcas de cacao procedentes de las variedades Criollo y CCN-51, se evidenció un efecto del tipo de cacao en la concentración de polifenoles. Según el trabajo de Murillo y

colaboradores [52]; los polifenoles totales (69,53 y 57,64 mg AGE•g<sup>-1</sup>) de cascavas de cacao criollo son superiores a los valores reportados para cacao complejo NacionalxTrinitario y clon CCN-51. Esto se debe a que las mazorcas de cacao criollo son de color amarillo verdoso y el Híbrido CCN-51 de color rojo anaranjado intenso. En este trabajo también se observó que existe un efecto de la zona de procedencia del cultivo, encontrándose valores inferiores en muestras del distrito de Pichanaki (Chanchamayo Junín, selva central del Perú) que en cacao ecuatoriano.

Así también, existe un efecto del método de preparación y análisis de la muestra [57], puesto que, se observó una menor concentración de bioactivos (polifenoles totales) en muestras deshidratadas mediante calor seco (secadores de cabina y túnel); presentando valores de 2,02 mg AGE•g<sup>-1</sup> para cacao fino de aroma, procedente de la Parroquia Ricaurte (Chone, Manabí, Ecuador).

#### 4.1.1.4. Flavonoides totales.

Dentro del contenido de antioxidantes totales presentes en la mazorca de cacao de la variedad complejo NacionalxTrinitario y clon CCN-51, se determinó la concentración de flavonoides totales por el método de la curva patrón y se validó la recta de calibrado, empleando catequina como estándar. La curva se preparó por triplicado durante tres días, presentando una curva promedio como se presenta en la Figura 12.



*Figura 12. Curva de calibración de flavonoides totales*

Los resultados presentados en la Figura 12, demuestran que existe una alta correlación ( $R^2=0,9994$ ) entre la concentración del estándar de catequina y la absorbancia medida por espectrofotometría UV-vis, permitiendo cuantificar con exactitud y precisión el contenido de flavonoides totales en las muestras de mazorca de cacao.

## Validación de la curva patrón

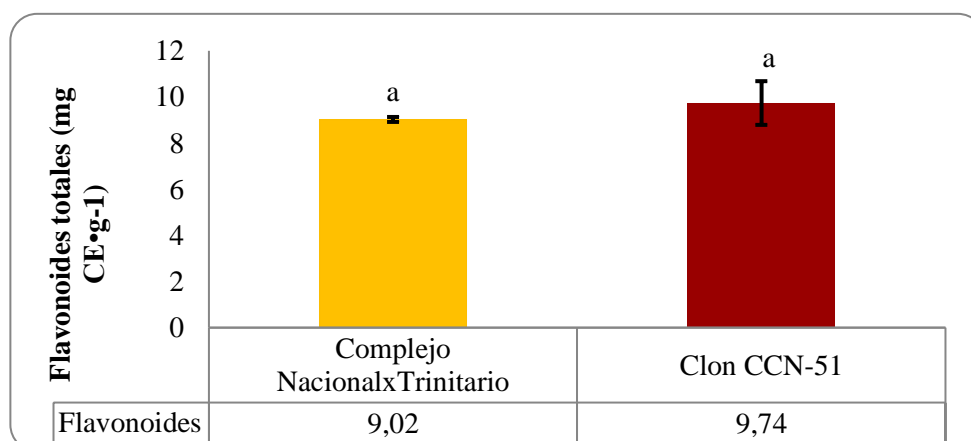
Para la determinación de flavonoides totales mediante el método de curva patrón se validó la recta de calibrado como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Validación de la curva de calibración de catequina para el método de determinación de flavonoides totales.

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	GLOBAL
<b>m (pendiente)</b>	0,0040	0,0038	0,0032	0,0036
<b>Lo (ordenada al origen)</b>	0,0645	0,0696	0,0571	0,0637
<b>Sy, x (error típico)</b>	0,0034	0,0043	0,0042	0,0040
<b>sm (Desv st pendiente)</b>	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001
<b>SLo (Desv. St ordenada)</b>	0,0027	0,0033	0,0032	0,0031
<b>t (student)</b>	2,7764	2,7764	2,7764	2,7764
<b>m(min)</b>	0,0038	0,0036	0,0030	0,0035
<b>m(máx)</b>	0,0041	0,0039	0,0033	0,0038
<b>Lo (min)</b>	0,0571	0,0604	0,0481	0,0552
<b>Lo (máx)</b>	0,0718	0,0789	0,0661	0,0723

Los resultados presentados en la Tabla 9, corresponden a los valores de las curvas de calibración representativas de tres ensayos realizados durante tres días. Con el fin de obtener siempre la linealidad de la curva se promediaron las pendientes. El valor de la pendiente fue  $0,0036 \pm 0,0001$  y el valor de la ordenada al origen fue de  $0,0637 \pm 0,0031$ .

En la Figura 13, se muestran los resultados de la concentración de flavonoides totales medidos en muestras de mazorca de cacao de complejo NacionalxTrinitario y clon CCN-51



**Figura 13.** Contenido de flavonoides totales en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 13, las muestras de mazorca de cacao de la variedad clon CCN-51 (9,74 mg CE•g<sup>-1</sup>) presentaron un mayor contenido de flavonoides totales que las muestras de la variedad complejo NacionalxTrinitario (9,02 mg CE•g<sup>-1</sup>). Los resultados presentados en la Tabla 10, demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las dos muestras de mazorca de cacao estudiadas; evidenciándose que no existe un efecto de la variedad de cacao en contenido de flavonoides totales. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula (H<sub>0</sub>), con un valor de  $t_{\text{student calculado}}$  inferior (-0,954674907) al valor de  $t_{\text{crítico}}$  (6,313751515).

**Tabla 10.** Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de Flavonoides Totales.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Cacao complejo NacionalxTrinitario</b>	<b>Cacao Clon CCN-51</b>
Media	9,024169915	9,736319792
Varianza	0,011569926	0,897536488
Observaciones	2	2
Coefficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-0,954674907	NS
P(T<=t) una cola	0,257379662	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,514759324	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Los valores presentados en este estudio (Figura 13) se encuentran dentro del rango reportado por Valadez y colaboradores [58], Van Tang y colaboradores[59] y Arce[33]; quienes obtuvieron concentraciones de flavonoides totales entre 2,91 y 24,96 mg CE•g<sup>-1</sup>.

De la misma forma que en el contenido de flavonoides totales, la cantidad de compuestos bioactivos del cacao dependen en gran medida de factores intrínsecos como el genotipo de procedencia y factores extrínsecos como el manejo agronómico, las condiciones del suelo, las condiciones climáticas y el manejo postcosecha [57]. Según el trabajo presentado por Van Tang y colaboradores, existió un mayor contenido de flavonoides totales en muestras de mazorca de cacao de variedad Trinitario procedentes de la comuna de Thanh Trieu (Chau Thanh, Ben Tre, Vietnam) [59].

Según el trabajo de Van Tang y colaboradores [59], en mazorcas de cacao de la variedad Trinitario se evidenció un efecto de la variedad en la concentración de flavonoides totales. El contenido de flavonoides totales (13,10 – 24,96 mg CE•g<sup>-1</sup>) en cascara de cacao Trinitario fueron superiores a los valores reportados para clon CCN-51. Por lo tanto, se puede demostrar que existe un efecto de la zona de procedencia de cultivo, encontrándose valores superiores en muestras procedentes de la comuna de Thanh Trieu (Chau Thanh, Ben Tre, Vietnam) que en cacao ecuatoriano.

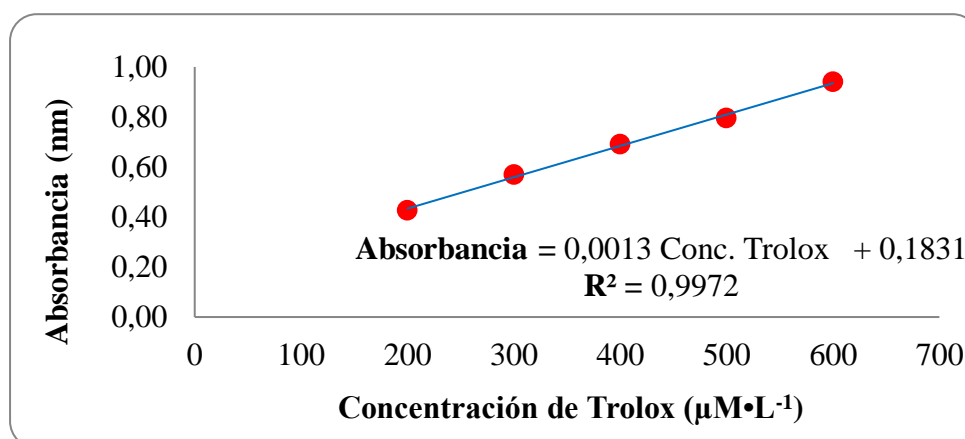
De igual manera, se encontró una menor concentración de flavonoides totales en muestras secadas por aire caliente; presentando valores de 2,91-6,01 mg CE•g<sup>-1</sup> en cacao de la variedad trinitario del clon TSH-565 procedente San Carlos (Santa Rosa de Pocosol, Costa Rica) [33].

#### 4.1.2. Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante de los subproductos del cacao como la cáscara de vaina o mazorca, almendra y mucílago, pueden atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos de tipo polifenoles y flavonoides [56].

##### 4.1.2.1. ABTS<sup>+</sup>.

La cuantificación de la actividad antioxidante se determinó mediante el método de la curva patrón, empleando una recta de calibrado de Trolox (0-700 μM•L<sup>-1</sup>), como estándar. En la Figura 14, se presenta una curva de calibración promedio que se preparó por triplicado durante tres días.



**Figura 14.** Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS<sup>+</sup>.

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 14, la curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de  $R^2=0,9972$ . Por lo tanto, se estableció que existe una alta correlación entre la concentración del estándar de Trolox ( $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y la absorbancia medida por espectrofotometría UV-vis, permitiendo cuantificar con exactitud y precisión el contenido de  $\text{ABTS}^+$  en las muestras de mazorca de cacao.

### Validación de la curva patrón

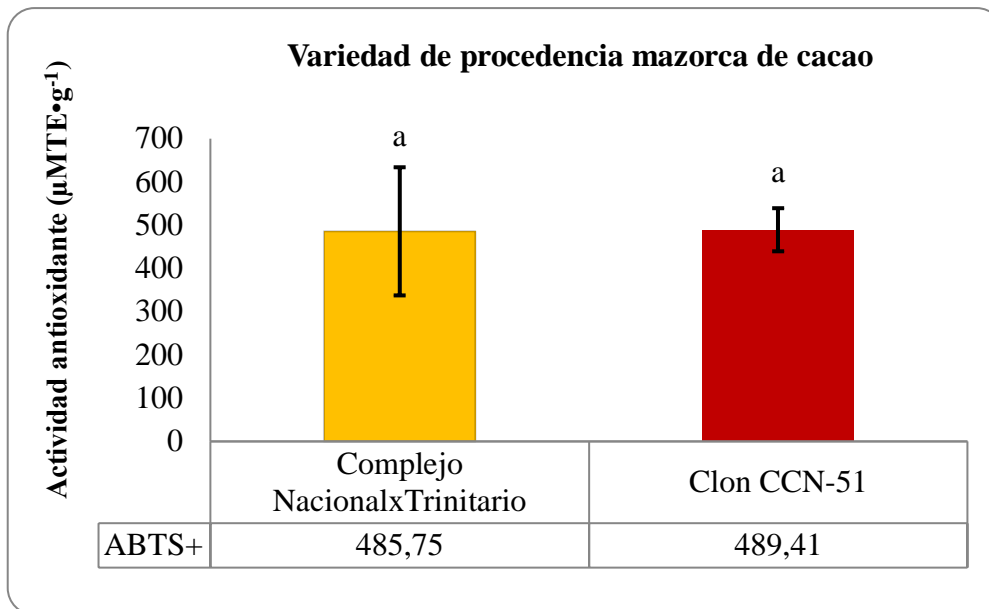
Para la determinación de actividad antioxidante ( $\text{ABTS}^+$ ) mediante el método de curva patrón se validó la recta de calibrado como se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Validación de la curva de calibración de Trolox ( $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para el método de determinación de actividad antioxidante ( $\text{ABTS}^+$ ).

Parámetro estadístico	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	GLOBAL
<b>m (pendiente)</b>	0,0014	0,0013	0,0013	0,0013
<b>Lo (ordenada al origen)</b>	0,0828	0,0936	0,0894	0,0886
<b>Sy, x (error típico)</b>	0,0089	0,0102	0,0095	0,0095
<b>sm (Desv st pendiente)</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<b>SLo (Desv. St ordenada)</b>	0,0120	0,0137	0,0127	0,0128
<b>t (student)</b>	3,1824	3,1824	3,1824	3,1824
<b>m(min)</b>	0,0013	0,0012	0,0013	0,0013
<b>m(máx)</b>	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
<b>Lo (min)</b>	0,0447	0,0499	0,0489	0,0478
<b>Lo (máx)</b>	0,1209	0,1373	0,1299	0,1294

Los resultados presentados en la Tabla 11, corresponden a los valores de las curvas de calibración representativas de tres ensayos realizados, durante tres días. Con el fin de obtener siempre la linealidad de la curva se promediaron las pendientes. El valor de la pendiente fue  $0,0013 \pm 0,0000$ , y el valor de la ordenada al origen fue de  $0,0886 \pm 0,0128$ .

En la Figura 15, se muestran los resultados de la concentración de actividad antioxidante ( $\text{ABTS}^+$ ) en muestras de mazorca de cacao de complejo Nacional x Trinitario y clon CCN-51



**Figura 15.** Actividad antioxidante por el método ABTS<sup>+</sup>, en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).

En base a los resultados presentados en la Figura 15, se estableció que la mazorca de cacao clon CCN-51 presentó un valor superior de actividad antioxidante con relación a la mazorca de cacao complejo NacionalxTrinitario.

Las muestras procedentes de cacao clon CCN-51 presentaron valores de actividad antioxidante de 489,41  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ , en las muestras de mazorca de cacao complejo NacionalxTrinitario los valores fueron de 485,75  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ . Los resultados presentados en la Tabla 12, demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos muestras de mazorca de cacao estudiadas. Para el método de ABTS<sup>+</sup>, no existe un efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en la actividad antioxidante de la mazorca de cacao, con un valor de  $t_{\text{student calculado}}$  inferior (-0,197204967) al valor de  $t_{\text{critico}}$  (6,313751515). aceptándose la hipótesis nula ( $H_0$ ),

**Tabla 12.** Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de ABTS<sup>+</sup>.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Cacao complejo NacionalxTrinitario</b>	<b>Cacao Clon CCN-51</b>
Media	485,7474958	489,4117438
Varianza	1859,796185	283,8543277
Observaciones	2	2
Coefficiente de correlación de Pearson	1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-0,197204967	NS
P(T<=t) una cola	0,438022968	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,876045936	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Los valores obtenidos en las muestras de estudio (Figura 15), fueron superiores a los resultados obtenidos por varios autores [56], [46] quienes obtuvieron valores de actividad antioxidante entre 2,48 y 229,57  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$  por el método del ABTS<sup>+</sup>.

En las investigaciones realizadas en muestras provenientes de Cone y Taura; (Guayas, Ecuador); se observó que la actividad antioxidante de mazorca de cacao es inferior (2,48 y 22,93  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ ) a las muestras tomadas de Asociación de Agricultores “La Cruz”. La diferencia de resultados en este estudio frente al trabajo de Martínez puede tener efectos a varios factores como el tipo de disolventes empleados en el proceso de extracción y la zona geográfica de procedencia de la muestra [56].

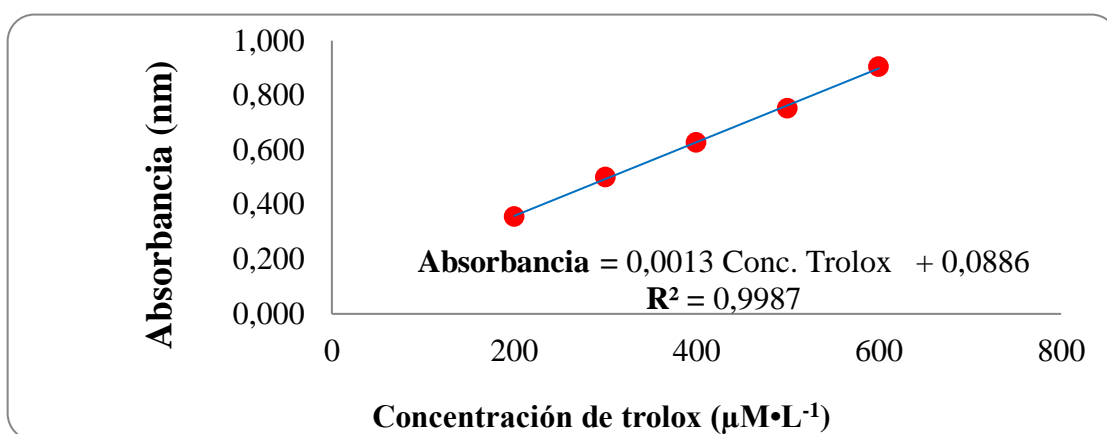
Según el trabajo de Samaniego y colaboradores [57], las muestras de cacao procedentes de diferentes regiones y cantones del Ecuador, muestran un efecto de la zona de producción (Costa y Amazonía) sobre el contenido de compuestos antioxidantes, indicando que el contenido antioxidante de la provincia del Guayas es significativamente diferente a la provincia de Los Ríos.

En investigaciones realizadas por Sotelo y colaboradores [46], se observó una mayor actividad antioxidante (ABTS<sup>+</sup>) en muestras secas (horno con circulación de aire) presentando valores de 116,12 - 229,57  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$  en cacao del clon TSH 565, procedentes del municipio de Tierralta, departamento de Córdoba (Colombia).

Según Martínez, la actividad antioxidante de los subproductos del cacao (cáscara de vaina, almendra y mucílago) podrían atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos como catequina, epicatequina y procianidina B2 [40].

#### 4.1.2.2. FRAP.

Para la determinación de la actividad antioxidante por el método de FRAP se empleó una curva de calibración promedio previamente validada, empleando Trolox ( $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como estándar. La curva se preparó por triplicado durante tres días, presentando una curva promedio como se observa en la Figura 16.



*Figura 16.* Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por FRAP.

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 16, la curva de calibración presentó un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0,9987, mostrándose una alta correlación entre la concentración del estándar de Trolox ( $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y la absorbancia medida por espectrofotometría UV-vis, permitiendo cuantificar con exactitud y precisión la actividad antioxidante por el método de FRAP en las muestras de mazorca de cacao.

#### Validación de la curva patrón

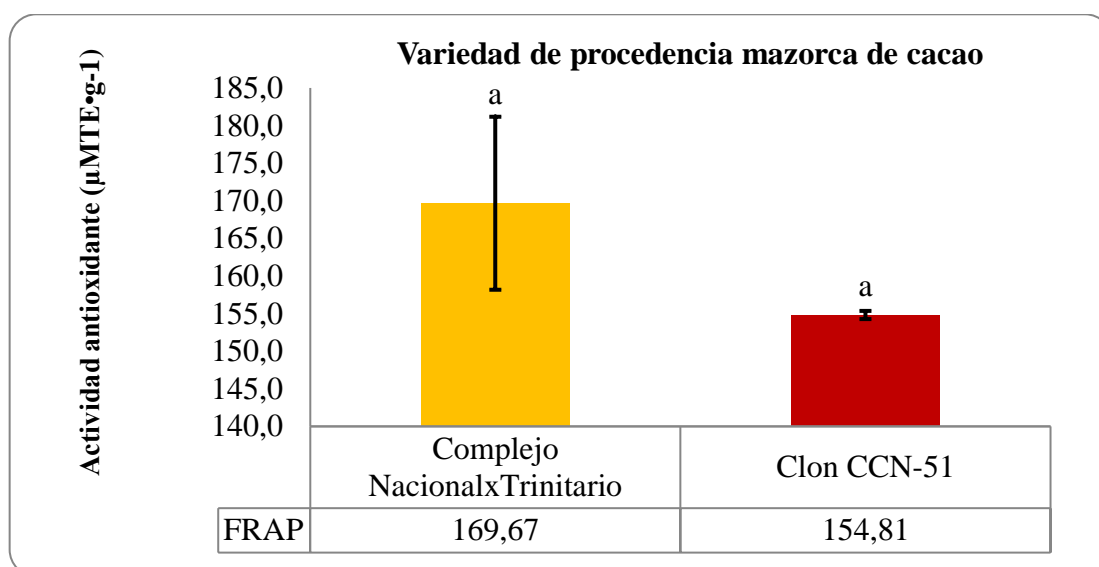
Para la determinación de actividad antioxidante (FRAP) mediante el método de curva patrón se validó la recta de calibrado como se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Validación de la curva de calibración de Trolox ( $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para el método de determinación de actividad antioxidante (FRAP).

Parámetro estadístico	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	GLOBAL
<b>m (pendiente)</b>	0,0013	0,0013	0,0011	0,0013
<b>Lo (ordenada al origen)</b>	0,1887	0,1907	0,1699	0,1831
<b>Sy, x (error típico)</b>	0,0119	0,0146	0,0112	0,0126
<b>sm (Desv st pendiente)</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<b>SLo (Desv. St ordenada)</b>	0,0160	0,0196	0,0151	0,0169
<b>t (student)</b>	3,1824	3,1824	3,1824	3,1824
<b>m(min)</b>	0,0012	0,0012	0,0010	0,0011
<b>m(máx)</b>	0,0014	0,0015	0,0012	0,0014
<b>Lo (min)</b>	0,1378	0,1284	0,1219	0,1294
<b>Lo (máx)</b>	0,2395	0,2530	0,2180	0,2368

Los resultados presentados en la Tabla 13, corresponden a los valores de las curvas de calibración representativas de tres ensayos realizados, durante tres días. Con el fin de obtener siempre la linealidad de la curva se promediaron las pendientes. El valor de la pendiente fue  $0,0013 \pm 0,0000$ , y el valor de la ordenada al origen fue de  $0,1831 \pm 0,0000$ .

En la Figura 17, se muestran los resultados de la concentración de actividad antioxidante medida por FRAP en muestras de mazorca de cacao de complejo NacionalxTrinitario y clon CCN-51.



**Figura 17.** Actividad antioxidante por el método FRAP, en cacao complejo NacionalxTrinitario (■) y Clon CCN-51(■).

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 17, se estableció la mazorca de cacao complejo NacionalxTrinitario, presentó un valor superior de actividad antioxidante con relación a la mazorca de cacao de clon CCN-51.

Las muestras procedentes de cacao complejo NacionalxTrinitario presentaron valores de actividad antioxidante de  $169,67 \mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$  y en las muestras de mazorca de cacao clon CCN-51 los valores fueron de  $154,81 \mu\text{mol TE} \cdot \text{g}^{-1}$ . Los resultados presentados en la Tabla 14, demuestran que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos muestras de mazorca de cacao estudiadas. Esto demuestra que no existe un efecto de la variedad de cacao clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario para la actividad antioxidante por el método de FRAP. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), con un valor de  $t_{\text{student calculado}}$  inferior ( $1,91770659$ ) al valor de  $t_{\text{crítico}}$  ( $6,313751515$ ).

**Tabla 14.** Prueba “t” de Student para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario) en el contenido de FRAP.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Cacao complejo NacionalxTrinitario</b>	<b>Cacao Clon CCN-51</b>
Media	169,6694181	154,8120187
Varianza	132,2674899	0,296115224
Observaciones	2	2
Coefficiente de correlación de Pearson	1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	1,91770659	NS
P(T<=t) una cola	0,153000379	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,306000757	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Según diversas investigaciones [56], [46] la mazorca de cacao presentan valores de actividad antioxidante entre  $2,00 - 169,25 \mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$ , en muestras de mazorca de cacao. En el trabajo de Martínez y colaboradores [56], se evaluó mazorcas de cacao de la variedad complejo NacionalxTrinitario, presentando una actividad antioxidante inferior en mazorca de cacao entre  $2,00$  y  $4,69 \mu\text{M TE} \cdot \text{g}^{-1}$ , existiendo un efecto en el método de extracción y procedencia de la muestra.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos en las muestras en estudio (Figura 16), fueron casi similares a los obtenidos por Sotelo y colaboradores [46] para mazorcas de cacao de variedad clon TSH 565. A pesar de que las muestras procedentes del municipio de Tierralta (Córdoba, Colombia), fueron preparadas mediante calor seco (secador de túnel de aire) mostraron una alta actividad antioxidante (136,13-169,25  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

**Tabla 15.** *Coefficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico.*

Compuestos fenólicos	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
	ABTS <sup>+</sup> (%)	FRAP (%)
<b>Carotenoides</b>	-9,4	76,1
<b>Polifenoles</b>	-24,13	-95,45
<b>Flavonoides</b>	25,32	-50,57

**Elaborado por:** *Aguirre Josselyn (2022).*

En la Tabla 15 se presenta el análisis de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante de la mazorca de cacao medida por los métodos de ABTS<sup>+</sup>, FRAP y el contenido de antioxidantes totales. En el método de ABTS<sup>+</sup> se evidenció una correlación positiva baja (25,32%), con el contenido de flavonoides totales. Mientras que, al correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de carotenoides totales, se observó que existe una correlación positiva alta (76,1%), entre este parámetro y la actividad antioxidante medida por el método de FRAP.

En la actividad antioxidante por el método de ABTS<sup>+</sup> se evidenció una correlación negativa baja no significativa (-9,4%; -24,13%), con el contenido de carotenoides y flavonoides totales. Al correlacionar la actividad antioxidante en el contenido de polifenoles totales se observó una correlación negativa muy alta con un valor de -95,45% y en flavonoides totales, una correlación negativa moderada (-50,57%), de actividad antioxidante medida por el método FRAP.

La falta de correlación entre la actividad antioxidante y los antioxidantes totales de la mazorca de cacao se debe a que en los coproductos de cacao la capacidad antioxidante

depende de los compuestos polifenólicos como la familia de los flavan-3-ol como: monómeros Catequina y Epicatequina, y el dímero Procianidina B2. Sin embargo, estos compuestos fenólicos no forman parte del perfil de compuestos fenólicos de la mazorca de cacao.

Por lo tanto, los compuestos bioactivos del cacao y sus subproductos (mazorca, cascarilla, mucilago y placenta), presentan propiedades de eliminación de radicales libres, capacidad para quelar metales prooxidantes, capacidad de retardar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y efecto cardioprotector debido a la interferencia de estos compuestos con varios de los mecanismos asociados a la aterosclerosis. Sin embargo, este efecto benéfico depende de otros compuestos bioactivos que no han sido identificados en la mazorca de cacao [60].

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones.

- La mazorca de cacao es un residuo de la cadena de beneficio del cacao, rico en compuestos bioactivos como; carotenoides (4155,31-8090,25  $\mu\text{g/g}$ ) polifenoles (35.58- 38.13  $\text{mg AGE}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y flavonoides totales (9,02-9,74  $\text{mg CE}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Sin embargo, carece de antocianinas en su composición.
- La mazorca de cacao del clon CCN-51 presento un contenido de polifenoles, flavonoides y carotenoides totales de 38.13  $\text{mg AGE}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 9,74  $\text{mg CE}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 4.16  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ; respectivamente. Para complejo NacionalxTrinitario el contenido de polifenoles, flavonoides y carotenoides totales fueron de, 35.58  $\text{mg AGE}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 9,02  $\text{mg CE}\cdot\text{g}^{-1}$ ; 8.09  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ; en ese orden.
- El contenido de antioxidantes totales y la actividad antioxidante encontrada en la mazorca de cacao podría estar asociado a la coloración rojiza del clon CCN-51, por su alto contenido de polifenoles totales y flavonoides totales; mientras que el color amarillo del complejo NacionalxTrinitario podría asociarse con el contenido de carotenoides totales.
- La actividad antioxidante de las mazorcas de cacao clon CCN-51 presentaron valores de 489,41  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$  (ABTS<sup>+</sup>); 154,81  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$  (FRAP). La actividad antioxidante del complejo NacionalxTrinitario presentaron concentraciones de 485,75  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ , en el método del ABTS<sup>+</sup> y 169,67  $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$  para el método de FRAP.
- De acuerdo con los resultados obtenidos existe un efecto de la variedad en el contenido de carotenoides totales de mazorcas de cacao de las variedades clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario. Sin embargo, el contenido de flavonoides totales, polifenoles totales y actividad antioxidante (ABTS<sup>+</sup> y FRAP), no presentaron un efecto estadísticamente significativo de la variedad de procedencia, con un valor  $t_{\text{student calculado}}$  inferior al  $t_{\text{crítico}}$  (0,05), en todos los casos.

## **5.2. Recomendaciones.**

- Realizar investigaciones acerca del contenido de antioxidante totales y actividad antioxidante de las diferentes variedades genóticas de cacao, procedentes de diferentes zonas cacaoteras del Ecuador.
- Aprovechar los residuos de la cadena de beneficio de cacao y valorizarlos como subproductos en la industria agroalimentaria, química y farmacéutica, debido a sus características funcionales.
- Evaluar el efecto de las condiciones del almacenamiento y preparación de la muestra de mazorca de cacao en la calidad fitoquímica de los residuos para su aplicación.

## **CAPÍTULO VI**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 6.1. Bibliografía Consultada.

- [1] C. Elena, “Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli)fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido,” *Proy. Investig.*, 2016.
- [2] V. Muñoz and C. Quizphi, “Estudio del cacao ecuatoriano y propuesta de elaboración de productos de chocolatería artesanal a partir de cacao denominación de origen Manabí,” *Mycol. Res.*, vol. 113, no. 2, pp. 207–221, 2018, [Online]. Available: Cocoa above, Manabí, chocolate, denomination of origin, artisanal.
- [3] S. Durá, E. Perez, A. Fuentes, and J. Barat, “Cacao En Polvo Con Diferentes Grados De,” *Univ. Politécnica València*, 2016.
- [4] O. Vasquez and A. Anaya, “Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma,” pp. 1–2, 2016.
- [5] N. Delgado, *Plan de manejo integral de residuos derivados de la extracción de la pulpa de cacao en la hacienda Bellavista, Luz de América, provincia de Azuay-Ecuador*. 2018.
- [6] C. Balladares, “Caracterización físico-química de los desechos agrícolas del cacao y café del litoral ecuatoriano y su potencial empleo como biocombustibles,” *ULPGC: España*. pp. 1–198, 2016, [Online]. Available: [https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/22931/4/0736428\\_00000\\_0000.pdf](https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/22931/4/0736428_00000_0000.pdf).
- [7] R. Gómez, S. Villanueva, and M. Henríquez, “Tendencia mundial en la elaboración de productos derivados del cacao,” *Rev. Ing. UC*, vol. 26, p. 5, 2019, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/journal/707/70760276010/html/>.
- [8] S. Guanga, “Estudio y aprovechamiento de los residuos del cacao de la compañía Nestlé como estrategia comercial,” *Univ. Guayaquil Fac.*, vol. 1, pp. 1–106, 2018.
- [9] E. Castillo, C. Álvares, and Y. Contreras, “Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (theobroma cacao l.) Cosechados en Cauagua estado Miranda.Venezuela,” *Rev. Invest. (Guadalajara)*, vol. 42, pp. 154–175, 2018, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/journal/3761/376160247008/html/>.
- [10] K. Reyes, *Estudio del aprovechamiento de los residuos de cacao en el cantón Balao provincia del Guayas*. 2018.

- [11] Z. Coronel Álvarez, “Determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de las variedades CCN-51 y Nacional por distintos métodos,” vol. 2020, no. 1715958359, p. 2751430, 2021.
- [12] C. Mariaca, M. Zapata, and P. Uribe, “Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias,” *Rev. la Asoc. Colomb. Dermatología y Cirugía Dermatológica*, vol. 24, no. 3, pp. 162–173, 2016, doi: 10.29176/2590843x.292.
- [13] B. Salud, “Radicales libres,” *canal salud*, 2019. <https://www.salud.mapfre.es/nutricion/reportajes-nutricion/radicales-libres/>.
- [14] R. Cardozo, “Qué es la economía circular y por qué es importante.,” *Economía colaborativa*, 2019. <https://www.bbva.com/es/py/que-es-la-economia-circular-y-por-que-es-importante/>.
- [15] Bioenergy, “Valorización de residuos,” 2018. <https://geniabioenergy.com/que-es-la-valorizacion-de-residuos/#:~:text=¿Qué es la valorización de residuos%3F&text=La operación cuyo resultado principal,para cumplir una función particular.>
- [16] E. Martínez, “Compuestos bioactivos: de la evidencia científica a las alegaciones de salud en la publicidad y etiquetado,” 2015.
- [17] Anecacao, “El Cacao Ecuatoriano.” <http://www.anecacao.com/index.php/es/noticias/el-cacao-ecuatoriano.html#:~:text=La producción de cacao se,%2C desde la época colonial.>
- [18] A. Sosa, “Estudio del cacao fino de aroma,” *Fac. Artes y Humanidades*, p. 48, 2019.
- [19] J. T. Sapuro, “Efecto del procesamiento del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la capacidad antioxidante durante la obtención de licor y cocoa,” *Euphytica*, vol. 18, no. 2, p. 22280, 2016, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.006><http://dx.doi.org/10.1016/j.neps.2015.06.001><https://www.abebooks.com/Trease-Evans-Pharmacognosy-13th-Edition-William/14174467122/bd.>
- [20] R. Schilling and L. Regalado, “Manual para el manejo de cosecha , postcosecha y clasificación de cacao Para cacao de tipo genético: Trinitario y Forastero Fermentación en : Cajas Rohan,” 2009.
- [21] A. García, B. Pico, and R. Jimenez, “La cadena de producción del Cacao en Ecuador:

- Resiliencia en los diferentes actores de la producción.,” *Novasinerгия Rev. Digit. Ciencia, Ing. Y Tecnol.*, vol. 4, no. 2, pp. 152–172, 2021, doi: 10.37135/ns.01.08.10.
- [22] M. Lozano, “Utilización de los subproductos del beneficio del cacao: una revisión,” p. 31, 2020, [Online]. Available: <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/18805/Tesis Opcion de grado ingeniería de Alimentos Michael Lozano.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.
- [23] L. Rojas, “Aprovechamiento de la cáscara de cacao para la elaboración de un biocomposito con aplicación en la construcción sostenible,” vol. 53, no. 9, p. 6, 2019.
- [24] C. Ardila and S. Carreño, “Aprovechamiento de la cáscara de la mazorca de cacao como adsorbente,” Universidad Industrial de Santander, 2011.
- [25] Repsol, “Economía circular,” 2021. <https://www.repsol.com/es/sostenibilidad/economia-circular/index.cshtml>.
- [26] C. Tapia, “Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) Variedad arriba y ccn51 para la elaboración de una infusión,” *Fac. Ing. Carrera Aliment.*, p. 143, 2015, [Online]. Available: [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11981/1/AL\\_574.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11981/1/AL_574.pdf).
- [27] J. López, “Las biorrefinerías, una apuesta firme hacia la (bio)economía circular,” 2020. .
- [28] O. Escobar and L. M., “Biorefinería: un modelo de negocios de productos de alto valor agregado a partir de desechos agrícolas e industriales y promotora de desarrollo sustentable en el contexto de la bioeconomía,” *Memorias Y Boletines La Univ. Del Azuay*, vol. 1, pp. 199–214, 2018, [Online]. Available: <http://revistas.uazuay.edu.ec/index.php/memorias/article/view/187/177>.
- [29] E. Sanchez Alamo, “Efecto de tipos de secado del cacao (*Theobroma Cacao* L.) ccn-51 en la preservación de polifenoles totales y antocianinas,” 2017, [Online]. Available: <https://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/2460#:~:text=Los resultados obtenidos en la,con 6.76 g EAG%2F100g>.
- [30] E. Valencia, I. Figueroa, E. Sosa, M. Bartolomé, H. Martínez, and M. García, “Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas,” *Rev. la Fac. Ciencias Químicas*, vol. 16, pp. 1–15, 2017, [Online]. Available:

- <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/quimica/article/view/1583/1238>.
- [31] E. Ordoñez, A. Arevalo, and H. Rojas, “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*),” *Sci. Agropecu.*, vol. 10, p. 2, 2019, [Online]. Available: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2077-99172019000200003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172019000200003).
- [32] BBB News, “Qué son los flavonoides, por qué son buenos y en qué alimentos los puedes encontrar,” 2019.
- [33] V. Arce Marin, “Escuela de tecnología de alimentos trabajo final de graduación bajo la modalidad de investigación dirigida presentado a la escuela de tecnología de alimentos para optar por el grado de licenciatura en ingeniería de alimentos relación entre las característ,” 2018.
- [34] J. Zacarías, J. Rodrigo, and Z. Lorenzo, “Los beneficios de los carotenoides en la salud,” *IATA*, 2020. <https://www.iata.csic.es/es/noticias/los-beneficios-de-los-carotenoides-en-la-salud>.
- [35] J. T. Burgos and F. R. Calderon, “Determinacion del contenido de carotenoides totales en ocho especies de frutas y verduras comercializadas en la zona metropolitana de San Salvador,” *J. Chem. Inf. Model.*, p. 110, 2009.
- [36] F. Meléndez, Antonio; Vicario, Isabel; Heredia, “Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides,” *SciELO*, vol. 54, 2004, [Online]. Available: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000200003](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200003).
- [37] M. Barragán, J. Aro, and A. Muñoz, “Determinación de antocianinas y capacidad antioxidante en extractos de (*Muehlenbeckia volcanica*),” *Rev. investig. Altoandin*, vol. 22, 2020, [Online]. Available: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-29572020000200161&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-29572020000200161&script=sci_arttext).
- [38] M. Sangoluisa, C. Santacruz, and M. Salvador, “Efecto del método de extracción de antocianinas de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en la eficiencia de celdas solares sensibilizadas,” *ACI Av. en Ciencias e Ing.*, vol. 11, no. 2, pp. 352–369, 2019, doi: 10.18272/aci.v11i2.888.

- [39] N. Jamanca and S. Cruz, "Antioxidantes en los alimentos," *Editor. UNAB*, p. 105, 2017.
- [40] J. Zhunio, "Evaluación de la actividad antioxidante en el mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) Variedades: CCN-51 y nacional," pp. 19–25, 2020, [Online]. Available: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5311/1/T-UTEQ-0093.PDF>.
- [41] C. Huet, "Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas," *Univ. Complut. Madrid*, pp. 1–107, 2017, [Online]. Available: [http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA DEL CARMEN REGUILLO MUÑOZ.pdf](http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA_DEL_CARMEN_REGUILLO_MUÑOZ.pdf).
- [42] A. Benítez, J. Villanueva-Sánchez, G. González-Rosendo, V. E. Alcántar-Rodríguez, R. Puga-Díaz, and A. G. Quintero-Gutiérrez, "Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP)," *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 23, pp. 1–9, 2020, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244.
- [43] Alan, "Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma," *Arch. Latinoam.*, vol. 66, 2016, [Online]. Available: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2016/3/art-10/>.
- [44] N. Martínez, "Acción De Los Antioxidantes Presentes En Los Alimentos Sobre La Aterosclerosis," *Univ. Talca Fac. Ciencias La Salud Esc. Tecnol. Médica Acción*, vol. 1, no. 2, p. 34, 2019, [Online]. Available: <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/1103>.
- [45] B. Vizalque, E. Aliaga, L. Tejada, O. Book, P. Mollinedo, and PeñarrietaMauricio, "Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de chenopodium quinoa.," *Rev. Boliv. Química*, vol. 35, pp. 168–176, 2018, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/journal/4263/426358213006/html/>.
- [46] L. Sotelo, A. Alvis, and G. Arrázola, "Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (Theobroma cacao L.), determinación de su capacidad antioxidante," *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas*, vol. 9, no. 1, p. 124, 2015, doi: 10.17584/rcch.2015v9i1.3751.

- [47] I. Samaniego and E. Espín, “Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao. In Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias,” vol. 105, 2016.
- [48] W. Llerena, I. Samaniego, M. Navarro, J. Ortíz, I. Angós, and W. Carrillo, “Effect of modified atmosphere packaging (MAP) in the antioxidant capacity of arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), and tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) fruits from Ecuador,” *J. Food Process. Preserv.*, vol. 44, no. 10, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1111/jfpp.14757.
- [49] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, May 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- [50] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘Antioxidant Power’: The FRAP Assay,” *Anal. Biochem.*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, Jul. 1996, doi: 10.1006/ABIO.1996.0292.
- [51] P. Rapisarda, F. Fanella, and E. Maccarone, “Reliability of Analytical Methods for Determining Anthocyanins in Blood Orange Juices,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, pp. 2249–2252, Jul. 2000, doi: 10.1021/jf991157h.
- [52] S. Murillo, C. Fortunato, R. Ponce, and M. de J. Huamán, “Características fisicoquímicas, compuestos bioactivos y contenido de minerales en la harina de cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.),” *manglar*, vol. 17, 2020, [Online]. Available: <https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/148/264>.
- [53] L. F. Pérez Laytón and N. S. Pulido Molano, “Determinación experimental y modelamiento de los perfiles de extracción supercrítica para la obtención de compuestos bioactivos a partir de cáscara de cacao (clon CCN51),” p. 51, 2014.
- [54] M. K. Delgado Bautista, “Po Éxico,” *Entretextos*, vol. 7, 2007.
- [55] M. K. Mora Romero, Harold Alejandro; Pintado León, “Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de la mazorca del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao*).” 2022.

- [56] R. Martínez, P. Torres, M. A. Meneses, J. G. Figueroa, J. A. Pérez-Álvarez, and M. Viuda-Martos, “Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products,” *Food Res. Int.*, vol. 49, no. 1, pp. 39–45, 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2012.08.005.
- [57] I. Samaniego *et al.*, “Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 88, no. June 2019, p. 103448, 2020, doi: 10.1016/j.jfca.2020.103448.
- [58] L. Valadez-Carmona *et al.*, “Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cocoa pod husks (*Theobroma cacao* L.),” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 41, no. October 2016, pp. 378–386, 2017, doi: 10.1016/j.ifset.2017.04.012.
- [59] V. T. Nguyen, A. X. Tran, and V. A. T. Le, “Microencapsulation of phenolic-enriched extract from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.),” *Powder Technol.*, vol. 386, pp. 136–143, 2021, doi: 10.1016/j.powtec.2021.03.033.
- [60] A. C. Talleri and L. H. Mesía, “Composición químico nutricional, fenólicos, metilxantinas, compuestos volátiles y actividad antioxidante de la cobertura de chocolate,” pp. 3–4, 2010, [Online]. Available: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/4354/Composicion\\_BobadillaJimenez\\_Jannett.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/4354/Composicion_BobadillaJimenez_Jannett.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

## **CAPITULO VII**

### **ANEXOS**

*Anexo 1.Recepción del cacao para la extracción de la cáscara.*



Recepción del cacao



Rotulado de la mazorca Nacional

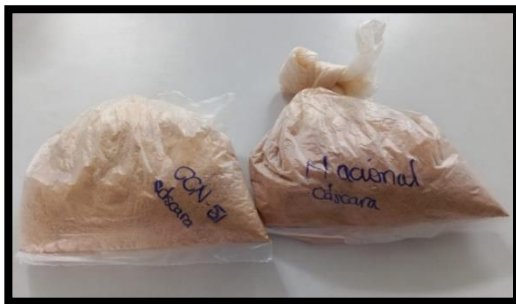


Rotulado de la mazorca CCN-51

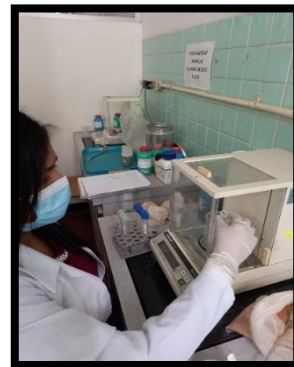


Mazorca en trozos

*Anexo 2.Muestra de la mazorca de cacao Liofilizada.*

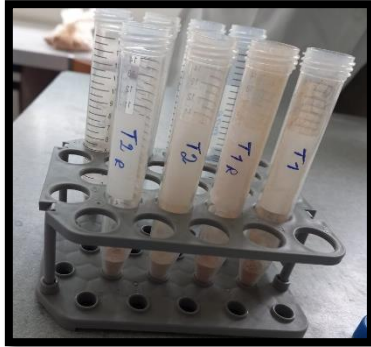


Mazorca clon CCN-51 y complejo NacionalxTrinitario

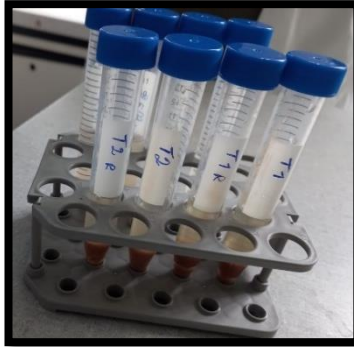


Peso de las muestras

*Anexo 3.Extracción de los compuestos bioactivos.*



Muestras en los tubos de centrifuga



Muestras con la solución



Agitación en el Vortex



Baño de ultrasonido



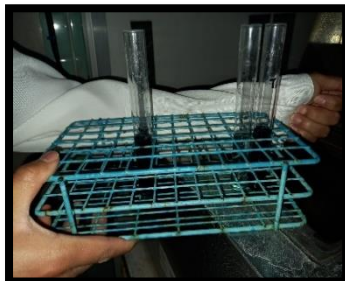
Llevar a centrifugar



Agregamos en orden los tubos en la centrifuga



Separando la fase



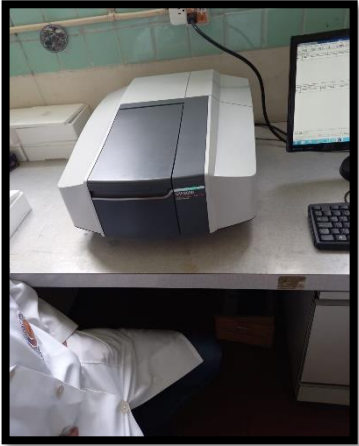


Llevar a baño María



Baño maría

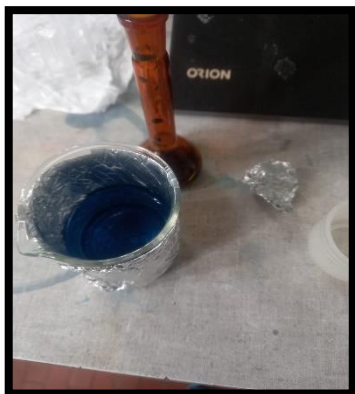
*Anexo 4. Medición de la absorbancia.*

		
Extracción de polifenoles totales	Celdas en el espectrofotómetro	Espectrofotómetro

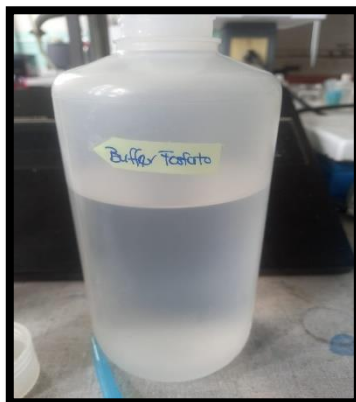
*Anexo 5. Determinación de flavonoides totales.*

		
Preparando la muestra	Muestras con NaOH	Cambio de color con el NaOH

*Anexo 6. Determinación de actividad antioxidante.*



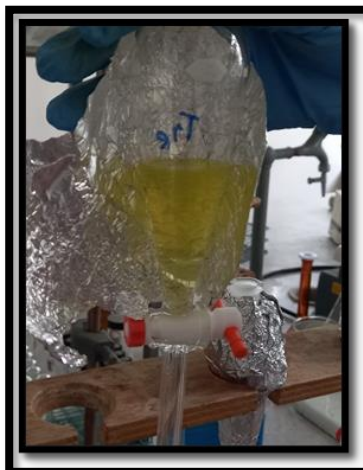
Preparando la muestra



Buffer Fosfato



Extracción de carotenoides



Separando fase acuosa



Agregando al balón de aforo



Balón de aforo con las soluciones



Soluciones activas



Muestras antocianinas