UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Unidad Integradora Curricular previo a la Obtención del título de Ingeniero en Alimentos

Título de la Unidad Integradora Curricular:

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDADES: CCN-51 Y NACIONAL".

Autor:

Billy Joel Zhunio Rodríguez

Tutores de la Unidad Integradora Curricular:

Ing. Wilma Maribel Llerena Silva (Directora)

Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua (Co-Director)

Mocache - Los Ríos – Ecuador

2020

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **ZHUNIO RODRÍGUEZ BILLY JOEL**, 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. _____

Zhunio Rodríguez Billy Joel

C.C. # 120657032-5

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, MSc.,** Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de Directora y Co-Director de la Unidad de Integradora Curricular **CERTIFICAMOS** que el estudiante **Zhunio Rodríguez Billy Joel**, realizó el proyecto de investigación de grado titulada **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDADES: CCN-51 Y NACIONAL"**, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, bajo nuestra dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.	Dr. Iván Samaniego Maigua, MSc.
DIRECTORA DE LA UNIDAD INTEGRADORACURRICULAR	**CO-DIRECTOR DE LA UNIDAD INTEGRADORA CURRICUILAR**

CERTIFICACIÓN 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, **MSc.,** Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de Directora y Co-Director de la Unidad de Integración Curricular, damos constancia que se ha revisado la Unidad de Integración Curricular titulada **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDADES: CCN-51 Y NACIONAL"** realizado por el Sr. Estudiante de la Carrera de Ingeniería en Alimentos Zhunio Rodríguez Billy Joel, certificamos que el porcentaje de similitud reportado por el **Sistema URKUND** es de 1% el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

URKUND

Document Information

Analyzed document	TFG_BILLYZHUNIO_20-11-2020_V8 corregida.docx (D86382184)
Submitted	11/23/2020 8:25:00 PM
Submitted by	
Submitter email	billy.zhunio2015@uteq.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	wllerenas.uteq@analysis.urkund.com

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.

DIRECTORA DE LA UNIDAD INTEGRADORACURRICULAR

Dr. Iván Samaniego Maigua, MSc.

CO-DIRECTOR DE LA UNIDAD INTEGRADORA CURRICUILAR

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Título:

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDADES: CCN-51 Y NACIONAL"

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

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Christian Vallejo Torres, MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Vicente Guerrón Troya MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. María Pacheco Tigselema, PhD.

MOCACHE- LOS RÍOS- ECUADOR

2020

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, ser divino por darme la vida y guiar mis pasos día a día.

Completamente agradecido con mi familia, en especial a mi madre la Sra. Judith Rodríguez por apoyarme en cada decisión y proyecto. A mis hermanos por su total apoyo en este camino estudiantil, gracias infinitas.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por los conocimientos impartidos a través de cada uno de los docentes y por permitirme formar parte del Proyecto del Fondo competitivo FOCICYT 2019-2020: VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE LA CADENA DE BENEFICIO DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS CON PROPÓSITOS FUNCIONALES.

A la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP), especial al Departamento de Nutrición y Calidad quienes permitieron llevar a cabo la presente investigación.

Agradecimientos infinitos a mis directores de tesis la Ing. Wilma Llerena Silva y el Dr. Iván Samaniego Maigua, por haberme bridando la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

A mis compañeros y más aún a los que se convirtieron en amigos, muchas gracias.

RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

En la presente investigación se determinó la actividad antioxidante de muestras de mucílago en proceso de fermentación de cacao complejo Nacional *x* Trinitario y CCN-51 provenientes de la colección (45 Kg de cada variedad) de la Asociación de Agricultores "La Cruz" del cantón Mocache, Provincia de Los Ríos. Con el objetivo de evaluar las propiedades funcionales de las dos variedades de cacao, se determinó la actividad antioxidante por $ABTS^+$ y FRAP aplicando espectrofotometría UV-VIS y por el método ORAC empleando fluorescencia. La actividad antioxidante de las muestras de mucílago de cacao medida por el método del $ABTS^+$ fue mayor, en comparación con los métodos de FRAP y ORAC, con valores de 8,54 μM TE• mL^{-1} en muestras de complejo Nacional *x* Trinitario y 3,40 μM TE• mL^{-1}, en CCN-51. La actividad antioxidante por el método de FRAP presentó valores de 7,89 y 3,35 μM TE• mL^{-1} para las muestras de mucílago de complejo Nacional *x* Trinitario y CCN-51, respectivamente. En el método de ORAC se identificó la menor actividad antioxidante presentando valores de 1,33 y 1,28 μM TE• mL^{-1} en las muestras de mucílago de complejo Nacional *x* Trinitario y CCN-51.

En base a estos resultados se puede determinar que este subproducto de la cadena de beneficio del cacao puede ser empleado en la industria alimentaria y farmacéutica, como fuente de antioxidantes. Esto permitirá valorar residuos de este importante sector con un enfoque en una política cero residuos.

Palabras claves: cacao, mucílago, actividad antioxidante, fluorescencia, $ABTS^+$, FRAP, ORAC.

ABSTRACT AND KEYWORDS

In the present investigation, the antioxidant activity of mucílage samples in the fermentation process of the Nacional x Trinitario complex cocoa and CCN-51 from the collection (45 Kg of each variety) of the "La Cruz" Farmers Association of the Mocache canton was determined Province of Los Ríos. With the objective of evaluating the functional properties of the two varieties of cocoa, the antioxidant activity was determined by $ABTS^+$ and FRAP applying UV-VIS spectrophotometry and by the ORAC method using fluorescence. The antioxidant activity of the cocoa mucílage samples measured by the $ABTS^+$ method was higher, compared to the FRAP and ORAC methods, with values of 8,54 μM TE• mL^{-1} in samples of the Nacional x Trinitario complex and 3,40 μM TE• mL^{-1}, in CCN-51. The antioxidant activity by the FRAP method presented values of 7,89 and 3,35 μM TE• mL^{-1} for the mucílage samples of the Nacional x Trinitario and CCN-51 complex, respectively. In the ORAC method, the lowest antioxidant activity was identified, presenting values of 1,33 and 1,28 μM TE• mL^{-1} in the mucílage samples of the Nacional x Trinitario and CCN-51 complex.

Based on these results, it can be determined that this by-product of the cocoa profit chain can be used in the food and pharmaceutical industry as a source of antioxidants. This will allow the assessment of waste from this important sector with a focus on a zero waste policy.

Keywords: cocoa, mucílage, antioxidant activity, fluorescence, $ABTS^+$, FRAP, ORAC.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO I 4
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN 4
1.1. Problema de la investigación 5
1.1.1. Planteamiento del problema. 5
1.1.2. Formulación del problema 7
1.1.3. Sistematización del problema. 7
1.2. Objetivos. 8
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. 14
2.2.1. Cacao. 14
2.2.2. Producción mundial de cacao. 15
2.2.3. Producción nacional de cacao. 16
2.2.4. Variedades de cacao. 17
2.2.5. Proceso de post-cosecha del cacao 20
2.2.6. Residuos generados durante la post-cosecha del cacao. 21
2.2.7. Valorización de los residuos de cacao 23
2.2.8. Industrialización del cacao. 24
2.2.9. Antioxidante. 25
2.2.10. Beneficios de los antioxidantes en la salud. 28
2.2.11. Capacidad antioxidante. 28
2.2.12. Microencapsulación de compuestos bioactivos. 32
CAPÍTULO III 33
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN 33
3.1. Localización. 34
3.2. Tipo de investigación. 34
3.2.1. Investigación Exploratoria 34
3.2.2. Investigación cuantitativa. 35

3.3. Métodos de la investigación. 35
3.3.1. Método inductivo-deductivo 35
3.3.2. Métodos estadísticos. 35
3.4. Fuentes de recopilación de información. 35
3.4.1. Fuentes Primarias. 35
3.4.2. Fuentes secundarias 36
3.5. Diseño de la investigación. 36
3.5.1. Esquema del ANDEVA. 37
3.5.2. Análisis de correlación 37
3.6. Instrumentos de la investigación. 38
3.6.1. Muestreo. 38
3.6.2. Manejo de post-cosecha. 39
3.6.3. Preparación de las muestras 39
3.6.4. Extracción de compuestos bioactivos 39
3.6.5. Determinación de capacidad antioxidante. 40
3.6.6. Microencapsulación. 43
3.7. Tratamiento de datos 43
3.8. Recursos humanos y materiales 44
3.8.1. Recursos humanos. 44
3.8.2. Materiales. 44
CAPÍTULO IV 46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 46
4.1. Resultados. 47
4.1.1. Validación de los métodos. 47
4.1.2. Actividad antioxidante. 51
CAPÍTULO V 57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 57
CAPÍTULO VI 60
BIBLIOGRAFÍA 60
60
5.1. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA 61
CAPÍTULO VII 71
ANEXOS 71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica y composición química del mucílago de cacao.....22
Tabla 2. Composición proximal de los residuos del cacao. 24
Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos para evaluar la capacidad antioxidante....30
Tabla 4. Localización del trabajo experimental.....34
Tabla 5. Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) en el contenido de actividad antioxidante en mucílago de cacao. 37
Tabla 6. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas. 38
Tabla 7. Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración Trolox para la validación de los métodos de actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC.....47
Tabla 8. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de la actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC. 49
Tabla 9. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes potenciales de nutrientes presentes en la mazorca de cacao..... 2
Figura 2. Países potenciales productores de cacao a nivel mundial 15
Figura 3. Producción de cacao en Ecuador en el año 2015.....16
Figura 4. Cacao Criollo.....17
Figura 5. Cacao Forastero 18
Figura 6. Cacao Trinitario 18
Figura 7. Cacao complejo Nacional x Trinitario 19
Figura 8. Cacao CCN-51.....20
Figura 9. Estructura química de los polifenoles 26
Figura 10. Estructura química de los flavonoides 27
Figura 11. Estructura de la vitamina C 27
Figura 12. Área neta bajo la curva (AUC) de la actividad antioxidante por el método ORAC 30
Figura 13. Trompeta de Horwitz 41
Figura 14. Curvas de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C).....48
Figura 15. Repetitividad de los métodos ABTS (A), FRAP (B) y ORAC (C) 50
Figura 16. Actividad antioxidante por los métodos ABTS (A), FRAP (B) y ORAC (C)....52

ANEXOS

Anexo 1. Árbol de problemas.....72
Anexo 2. Manejo de post-cosecha del cacao.....73
Anexo 3. Extracción de los compuestos bioactivos.....74
Anexo 4. Preparación de los reactivos de ABTS y FRAP. 74
Anexo 5. Determinación de la actividad antioxidante por los métodos ABTS, FRAP y ORAC.....75
Anexo 6. Prueba t de Student (dos muestras emparejadas) para los métodos ABTS, FRAP y ORAC.....75

CÓDIGO DUBLIN

Título	"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDADES: CCN-51 Y NACIONAL"
Autor	Zhunio Rodríguez Billy Joel
Palabras claves	cacao, mucílago, actividad antioxidante, fluorescencia, $ABTS^+$, FRAP, ORAC.
Editorial	Quevedo. UTEQ, 2020
Resumen	En la presente investigación se determinó la actividad antioxidante de muestras de mucílago en proceso de fermentación de cacao complejo Nacional x Trinitario y CCN-51 provenientes de la colección (45 Kg de cada variedad) de la Asociación de Agricultores "La Cruz" del cantón Mocache, Provincia de Los Ríos. Con el objetivo de evaluar las propiedades funcionales de las dos variedades de cacao, se determinó la actividad antioxidante por ABTS+ y FRAP aplicando espectrofotometría UV-VIS y por el método ORAC empleando fluorescencia. La actividad antioxidante de las muestras de mucílago de cacao medida por el método del ABTS+ fue mayor, en comparación con los métodos de FRAP y ORAC, con valores de 8,54 µM TE• mL-1 en muestras de complejo Nacional x Trinitario y 3,40 µM TE• mL-1, en CCN-51. La actividad antioxidante por el método de FRAP presentó valores de 7,89 y 3,35 µM TE• mL-1 para las muestras de mucílago de complejo Nacional x Trinitario y CCN-51, respectivamente. En el método de ORAC se identificó la menor actividad antioxidante presentando valores de 1,33 y 1,28 µM TE• mL-1 en las muestras de mucílago de complejo Nacional x Trinitario y CCN-51. En base a estos resultados se puede determinar que este subproducto de la cadena de beneficio del cacao puede ser empleado en la industria alimentaria y farmacéutica, como fuente de antioxidantes. Esto permitirá valorar residuos de este importante sector con un enfoque en una política cero residuos.
Descripción	76 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URL	

INTRODUCCIÓN

La producción y procesamiento de cacao cada día tiene mayor demanda a nivel mundial, los granos de esta materia prima se utilizan principalmente para elaboración de chocolate y productos derivados. Los continentes con la mayor producción de este fruto son: América (17,0%), África (73,1%), Asia y Oceanía (9,9%); alcanzando 3,9 millones de toneladas entre los años 2015 y 2016; sin embargo, este volumen de producción implica la generación de 16 millones de toneladas de biomasa residual (1)**.**

Ecuador, es el octavo país productor de cacao a nivel mundial, ubicándose en primer lugar en el cultivo de cacao fino de aroma; siendo especialmente apreciada la variedad Arriba. Por la calidad de las almendras, el país cubre el 50% de la oferta de este pequeño pero importante segmento del mercado mundial. Actualmente, en el país hay cerca de 100000 unidades productivas con más de 400000 hectáreas de este cultivo, en su gran mayoría en la región Litoral o Costa (85%), seguido por la región Andina (11%) y la región Amazónica (4%). El 95% de esta superficie está sembrada con la variedad CCN-51 y el 5% corresponde a la variedad complejo Nacional x Trinitario, con reconocimiento internacional (2,3)**.**

La industria cacaotera en el país involucra familias de pequeños y medianos productores. Guayas es el principal productor representando el 28% del cultivo total a nivel nacional, seguido por Los Ríos (23%), Manabí (13%), Esmeraldas (10%), El Oro (5%) y Sucumbíos (4%); alcanzando una producción total de 113 mil toneladas de cacao en el año 2017. En la región Sierra también se cultiva cacao, en provincias como Cotopaxi, Bolívar y Cañar, pero en menor porcentaje (14%) que en la regiones Litoral y Amazónica (4,5)**.**

En la cadena de beneficio del cacao, se aprovecha aproximadamente el 10% de la masa del fruto (Figura 1), el 90% restante de los componentes corresponde a cáscara, mucílago y cotiledones. Estos residuos, son depositados en el suelo, causando pérdidas y contaminación al medio ambiente. La almendra constituye un tercio (33%) del peso de la fruta, dejando atrás el 67% de cáscara, placenta y exudado como subproductos de desecho (6,7)**.**

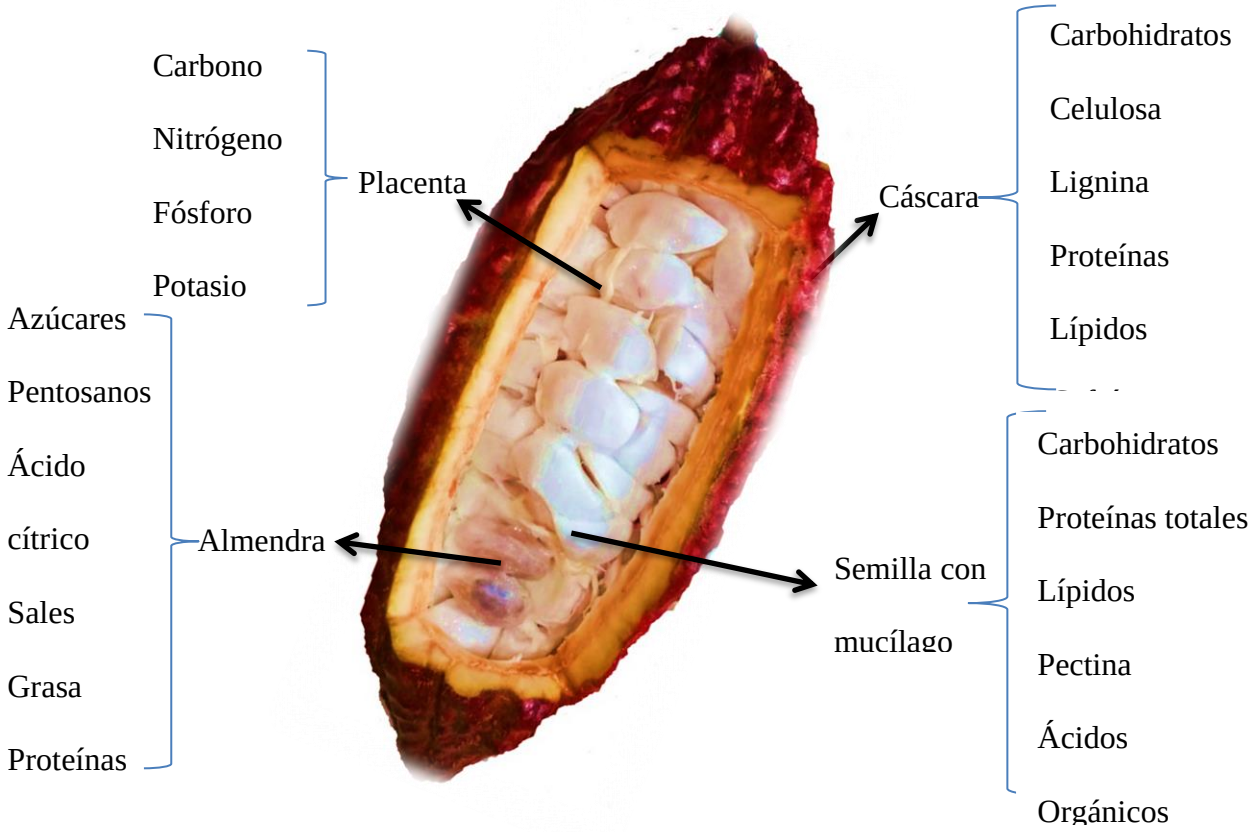


Figura 1. *Fuentes potenciales de nutrientes presentes en la mazorca de cacao*
Fuente: (7)

Investigaciones realizadas en cacao indican que las almendras y sus derivados contienen una fuente potencial de antioxidantes como los flavonoides, además de azúcar (10 – 15%), pectina (1%) y ácido cítrico (1,5%). Sin embargo, la biomasa residual que se genera en la post-cosecha y procesamiento del cacao también tiene compuestos bioactivos esenciales como fenoles, flavonoides, taninos y terpenoides. La importancia de estos componentes antioxidantes en los residuos del cacao se debe a que su consumo en pequeñas concentraciones aporta beneficios para la salud humana por su efecto en el desempeño de funciones fisiológicas, antioxidantes y antimutagénicas (1,6,8)**.**

El mucílago o exudado es un residuo de la fermentación del cacao que tiene un gran potencial para ser empleado como un medio de cultivo rico en proteínas, minerales, ácidos orgánicos y para el desarrollo de microorganismos de interés industrial como la *Saccharomyces cerevisiae*. Además, posee una excelente composición de azúcares, minerales y ausencia de sustancias

tóxicas (1). Normalmente en la fermentación de las almendras de cacao se desperdician más de 70 L• Ton^{-1} de este material mucílaginoso (6).

De acuerdo a investigaciones realizadas por Batista y colaboradores (2016), estos residuos pueden ser fuentes ricas en metilxantinas, compuestos fenólicos (epicatequina, polifenoles y antocianinas) y una gran variedad de compuestos volátiles que le proporcionan propiedades antioxidantes (8).

Se entiende por propiedad antioxidante, a la capacidad que posee una sustancia para retardar o impedir la degradación oxidativa de otras moléculas (ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas) que ocurren bajo la influencia del oxígeno atmosférico. Estos disminuyen el efecto oxidativo de los radicales libres y reducen el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares; por lo que, recibe el nombre de antioxidante terminador de cadena (9,11).

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

En la actualidad, en Ecuador existe una importante producción y exportación de cacao (315571 TM) debido a la excelente calidad de las almendras (aroma y sabor único, composición nutricional), lo que conlleva a una mayor demanda a nivel nacional como internacional. Sin embargo, este rubro genera cantidades significativas de residuos como cáscara, mucílago y placenta (12,13)**.**

El limitado conocimiento de los productores y la falta de interés de las industrias, evita que exista un buen manejo de estos residuos orgánicos, ocasionando pérdidas económicas al agricultor y a las empresas chocolateras. Según el estudio realizado por Delgado (2018) y las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) el aprovechamiento de las semillas por cada mazorca de cacao es del 18,79%; generándose un 81,21% de biomasa residual entre cáscara (71,73%), mucílago (6,41%) y placenta (3,07%) (6,14)**.**

Actualmente se generan 18 200000 L• $año^{-1}$ de pulpa mucilaginosa lo que provoca acumulación de estos residuos y contaminación al medio ambiente, debido a olores pútridos, presencia de insectos (mosquitos, moscas y hormigas) (12,13)**.**

En la actualidad residuos como la cáscara y mucílago han captado interés científico debido a que algunos investigadores le han atribuido propiedades benéficas por la presencia de polifenoles, flavonoides y ácidos orgánicos. De acuerdo a estos estudios, el contenido de compuestos bioactivos en los residuos depende de diferentes factores como el grado de madurez, la variedad de cacao y las condiciones medioambientales (temperatura, humedad, sequedad) del cultivo (1,15)**.**

La finalidad de la presente investigación es aprovechar los compuestos funcionales de los subproductos del sector productor de cacao (agricultores) para la extracción de compuestos funcionales, con efecto benéfico en la salud. Estos componentes contribuyen en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, demostrando efectos antimicrobianos, antivirales y protectores contra enfermedades cardiovasculares. El principal interés de este estudio es el

determinar la actividad antioxidante de los residuos agroindustriales de dos variedades de cacao ecuatoriano (1).

Diagnóstico.

En el país existe una excesiva acumulación e inadecuado manejo de residuos orgánicos provenientes de la explotación cacaotera, lo que ha ocasionado inquietud y malestar a nivel social, económico y ambiental (Anexo 1). En la parte social, la acumulación de residuos afecta a la calidad de vida de la población por la generación de olores desagradables y presencia de insectos.

A nivel económico, los agricultores desechan un material mucílaginoso rico en nutrientes que podría emplearse como materia prima de la industria alimentaria, sumando un nuevo ingreso económico a los productores. Además, de mejorar los ingresos de los campesinos que cultivan cacao, se incrementará la demanda de mano de obra de las poblaciones aledañas, generando nuevas fuentes de empleo.

En la parte ambiental, este residuo se convierte en un medio de cultivo para hongos patógenos como *Phytophthora spp.*; el cual, es el causante de enfermedades en la planta de cacao como la podredumbre de los tejidos internos y externos de la fruta. Sin embargo, la limitada información en cuanto a investigaciones y tecnologías adecuadas para el tratamiento industrial del exudado de cacao ha llevado a los agricultores y empresarios a desperdiciar compuestos con propiedades antioxidantes con un gran potencial para el desarrollo de productos funcionales de alto poder antioxidante.

Pronóstico.

Hoy en día, existe un gran volumen de producción de cacao, lo que implica un incremento importante de la cantidad de desechos que se descargan al ambiente. Al no existir estudios que permitan aprovechar los lixiviados de la fermentación del cacao se incrementará de forma descontrolada la cantidad de material mucílaginoso, que a su vez podría causar malestar en las poblaciones aledañas a los cultivos y centros de acopio debido a olores pútridos y propagación de enfermedades por insectos y roedores. Por otro lado, la descarga de lixiviados en el campo

seguirá propagando enfermedades como el hongo *Phytophthora spp*., pudiendo llegar a diezmar los cultivos.

La contaminación paulatina por parte de los agricultores e industrias procesadoras puede representar pérdidas económicas al sector, debido al cobro de multas por parte del Ministerio de Ambiente. Además, de la disminución de ingresos monetarios por la posible venta de biomasa residual.

1.1.2. Formulación del problema.

En la actualidad existe una limitada cantidad de información respecto a la actividad antioxidante del mucílago de cacao, tanto a nivel nacional como internacional. Por lo tanto, es una gran oportunidad en el campo científico el estudio de los residuos agroindustriales del sector cacaotero para el desarrollo de productos funcionales a partir del exudado que se genera previamente a la etapa de fermentación. Por lo que, se plantea la siguiente interrogante de investigación:

¿Los compuestos antioxidantes del mucílago de cacao de las variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario presentan una importante actividad antioxidante, que permita el desarrollo de nuevos productos funcionales?

1.1.3. Sistematización del problema.

- ¿Se puede valorizar los residuos del sector cacaotero como beneficio para los productores e industrias?
- ¿El mucílago de cacao contiene actividad antioxidante?
- ¿Existe un efecto de las variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario sobre las propiedades antioxidantes del mucílago de cacao?
- ¿Qué métodos de aislamiento serán el más adecuado para obtener y conservar los compuestos bioactivos del exudado de cacao?
- ¿La utilización industrial de los residuos disminuye el impacto ambiental?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

Evaluar la actividad antioxidante presente en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedades: CCN-51 y Nacional.

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Determinar el efecto de la variedad sobre la actividad antioxidante del exudado del cacao.
- Correlacionar la actividad antioxidante con el contenido de antioxidantes presente en el mucílago de dos variedades de cacao.
- Identificar los métodos más adecuados de aislamiento y conservación de los compuestos antioxidantes.
- Sugerir las aplicaciones alimentarias de los compuestos bioactivos del mucílago de cacao.
- Valorizar los residuos de la industria cacaotera como beneficio para los productores e industrias.

1.3. Justificación.

La producción de cacao en el Ecuador ha permitido que la economía de más de 500 mil familias dependa de este noble cultivo (16). La generación de biomasa residual, es el principal problema que enfrentan los agricultores y las industrias chocolateras. Puesto que, durante las últimas décadas residuos como el mucílago no están siendo aprovechados de forma integral por las empresas. Sin embargo, se han desarrollado diversos productos a escala industrial sin un valor comercial importante para la industria alimentaria. Por lo que, se ha destinado a producción de biocombustibles, productos químicos, hidrógeno biológico y biomateriales (1).

Los residuos agroindustriales han sido reconocidos como fuentes importantes de algunos compuestos químicos prominentes que se les podría aplicar una estrategia viable para obtener compuestos bioactivos, por lo tanto, la explotación de estos residuos orgánicos es importante porque permite disminuir la contaminación ambiental y generar un ingreso alternativo para los agricultores. A pesar de esto, en Ecuador se desconoce la tecnología apropiada para la transformación de residuos generados durante la cosecha, post-cosecha e industrialización del cacao (1,16,17).

Las empresas alimentarias dedicadas a valorización y reutilización de subproductos centran sus esfuerzos en el aprovechamiento de compuestos antioxidantes. Para su conservación, es necesario considerar la sensibilidad de estos fitoquímicos de los factores ambientales como luz, oxígeno y humedad; por lo que, se debe aplicar técnicas como microencapsulación para proteger y conservar dichos antioxidantes. Es importante conservar estos compuestos bioactivos, debido a que contrarrestan los efectos de los radicales libres y protegen al cuerpo humano de enfermedades cardiovasculares, cáncer, trastornos neurales, úlcera y envejecimiento (18,19).

El propósito de la siguiente investigación es determinar la actividad antioxidante de dos variedades de cacao CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario por diferentes métodos, para el uso de microencapsulados que posteriormente se emplearan en el desarrollo de alimentos funcionales. Además, de aprovechar el efecto benéfico de estos componentes se disminuirá la contaminación ambiental.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual.

- **Valorización de residuos**

La valorización de residuos es un conjunto de alternativas que se emplean para la gestión de desechos agroalimentarios; dando lugar a numerosas posibilidades para la producción de subproductos de alto valor agregado. Esta alternativa de gestión de desperdicios de la industria ha captado gran atención, puesto que, disminuye la descarga de material orgánico en vertederos; obteniéndose productos económicos, ricos en nutrientes y fitonutrientes (20,21)**.**

- **Mucílago**

El mucílago o baba es una sustancia viscosa aromática que cubre las semillas de cacao, por lo que se la conoce como tegumentos. Está pulpa mucilaginosa se conforma de células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) (11-13%), pectina (0,5-1,5%), hemicelulosa (0,2-3%), celulosa (0,7-0,9), agua (80-85%), ácido cítrico (0,3-1,3%) y polifenoles (0,16%) (22,23)**.**

- **Fermentación**

La fermentación es un proceso de transformación de determinados sustratos (medio de cultivo) por acción microbiana; generando variaciones de temperatura, pH y humedad. Los microorganismos incrementan su concentración en el transcurso del proceso, mientras que, el medio se modifica y forman nuevos productos como consecuencia de las actividades metabólicas (metabolitos y biomasa) (22,24). En la fermentación de las almendras de cacao los azúcares se transforman en alcoholes. Las semillas sufren una serie de cambios fisicoquímicos como el cambio de la pigmentación interna y el sabor astringente; siendo responsables del desarrollo de sabor y aroma del chocolate (3)**.**

- **Exudado**

El exudado de cacao es un líquido que se desprende de las almendras durante la fermentación, por la acción de enzimas pectinolíticas producidas por las levaduras y bacterias ácido-lácticas. Esto provoca la hidrólisis del mucílago, dando lugar a la exudación de líquidos que se drenan a través de los agujeros en el fondo de las cajas (25,26)**.**

- **Fitonutrientes**

Los fitonutrientes o fitoquímicos son sustancias o compuestos naturales producidos por las plantas, cuya función principal es actuar como sistema de defensa contra hongos y bacterias. Estos fitonutrientes también han demostrado efectividad contra diversas enfermedades fortaleciendo el sistema inmunológico. Estos fitoquímicos se clasifican en varias clases, según su composición química: polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, ligninas, antocianinas), alcaloides, esteroides, carotenoides y terpenoides (27)**.**

- **Radicales libres**

Los radicales libres (RL) son cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados, considerados como productos normales de muchas vías metabólicas. Algunos están presentes en el organismo en forma controlada (enjaulada), donde realizan funciones esenciales. Otros componentes están en forma libre e interactúan con varias sustancias del tejido, pero también pueden proporcionar un control esencial de las vías de señalización de óxido reducción reguladas. Sin embargo, las concentraciones elevadas de RL son dañinas y están implicados en numerosos procesos patológicos como cáncer, hipertensión, entre otras (28,29)**.**

- **Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante, es la capacidad que posee una sustancia o molécula para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes le aportan un sistema de defensa a células, tejidos y fluidos biológicos de nuestro cuerpo, ayudando a contrarrestar el daño oxidativo de los RL (9,30)**.**

- **Efecto antiinflamatorio**

El efecto antiinflamatorio es una propiedad que se le atribuye a los componentes fitoquímicos de origen natural, cuya función es disminuir afecciones inflamatorias como artritis y alergias. El proceso de inflamación es una respuesta inmune complicada que se define como la liberación secuencial de citoquinas donde uno de los principales medios de hinchazón son el óxido nítrico (NO); el cual es reducido por efecto de estos fitoquímicos (31)**.**

- **Enfermedades Crónicas No Transmisibles**

Las enfermedades Crónicas No transmisibles (ECNT), son afecciones de larga duración (mayor a 6 meses), por lo general son de progresión lenta y no se transmiten de persona a persona. Al ser enfermedades de curso prolongado necesitan tratamientos continuos para su control; como es el caso del leucemia, las enfermedades respiratorias crónicas, cardiovasculares y la diabetes (32)**.**

- **Espectrofotómetro UV-Vis**

El espectrofotómetro UV-Vis, es un dispositivo de medición para el análisis cuantitativo confiable y de bajo costo que generalmente se utiliza para caracterizar sustancias químicas determinando la cantidad de luz que es parcialmente absorbida por el analito presente en la solución. Se puede clasificar según la región espectral de trabajo, como espectrofotómetro ultravioleta o UV (190 nm a 380 nm); espectrofotómetro visible (Vis) de 380 nm a 750 nm y espectrofotómetro infrarrojo cercano (NIR) de 800 nm a 2500 nm (33,34) .

- **Alimentos funcionales**

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos, que ejercen efectos beneficiosos y nutricionales básicos sobre una o varias funciones del organismo. Su consumo se traduce en una mejora de la salud o en una disminución del riesgo de sufrir enfermedades. En general, se consideran alimentos funcionales a aquellos que se consumen como parte de una dieta normal y que contienen biocompuestos que afectan las funciones del organismo de manera positiva, promoviendo un efecto fisiológico más allá de su valor nutritivo tradicional. (35)**.**

- **Compuestos bioactivos**

Los compuestos bioactivos son sustancias naturales en los alimentos que no poseen una función nutricional básica en el organismo humano; pero, aportan cierta actividad biológica dentro del mismo. Están implicados en diferentes procesos metabólicos, que reducen el riesgo de padecer distintas enfermedades degenerativas; por lo que, mejora el estado del bienestar del individuo que los consume (17,36,37)**.**

- **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, responsables del color azul, rojo y morado de algunas frutas. Se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Debido a su estructura química, una de las principales propiedades biológicas de estos compuestos es su alta actividad antioxidante. Estos contienen uno o varios núcleos fenólicos y una cadena lateral insaturada que les permite formar un radical fenoxilo estabilizado; por lo que, actúan como secuestradores de radicales libres (38)**.**

- **Microencapsulación**

La microencapsulación es una tecnología que se aplica para encerrar o aislar materiales sólidos, líquidos o gaseosos. Según Figueroa y colaboradores (2016) esta técnica es de gran interés para las industrias farmacéutica y alimentaria, puesto que permite que los componentes bioactivos de interés estén protegidos contra agentes externos como oxígeno y humedad. Esto aumenta significativamente la vida útil de los fitonutrientes y pueden ser almacenados durante tiempos prolongados, sin afectar su apariencia y composición. Además, de mencionar que la microencapsulación puede eliminar sabores y olores desagradables (fermentación, rancidez) (39,40)**.**

2.2. Marco Referencial.

2.2.1. Cacao.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol tropical, de la familia Malvaceae. Su nombre científico proviene de dos vocablos griegos Theo (Dios) y broma (alimento); que en conjunto significa alimento de los dioses. Sin embargo, el término cacao tiene origen Olmeca y se lo asocia al proceso de domesticación de la planta.

El género *Theobroma* originario de la cuenca amazónica de América del Sur, que bordea las zonas de Brasil, Ecuador, Perú, Venezuela y Colombia y que posteriormente se dispersó a lo largo de la cordillera Andina hasta el Caribe y el Pacífico de América Central. Por esta razón se diferencian dos grandes grupos de cacao: Criollo y Forastero. El cacao Criollo es considerado

de alta calidad y buen sabor; mientras que, el cacao Forastero se caracteriza por su precocidad y resistencia a enfermedades (26,41,43).

El cultivo de cacao se desarrolla en superficies que van desde el nivel mar hasta los 800 metros de altitud a una temperatura ambiental entre 24 y 26°C y máximo el 60% de humedad relativa. Es indispensable una buena luminosidad con aproximadamente 2000 horas luz al año. La velocidad del viento entre 1 a 2 m• seg^{-1} y la pluviosidad de 1500 a 2000 milímetros de agua. Para asegurar un buen rendimiento este frutal debe crecer en suelos francos y profundos con subsuelo permeable, rico en nutrientes (zonas de aluviales) y con pH neutro (6,0 y 6,5) (22,45).

2.2.2. Producción mundial de cacao.

El cacao se produce en diferentes países del mundo (Figura 2), pero paises africanos como Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria y Camerún abarcan el mayor porcentaje de la producción mundial. Sin embargo, en Brasil, Ecuador, Perú, Colombia y República Dominicana también se cultiva este fruto; aunque en menor porcentaje. La producción a nivel mundial se encuentra distribuida de la siguiente manera: África 71,5 %, Latinoamérica 18 % y otros países de Asia y Oceanía 9,5 % (43).

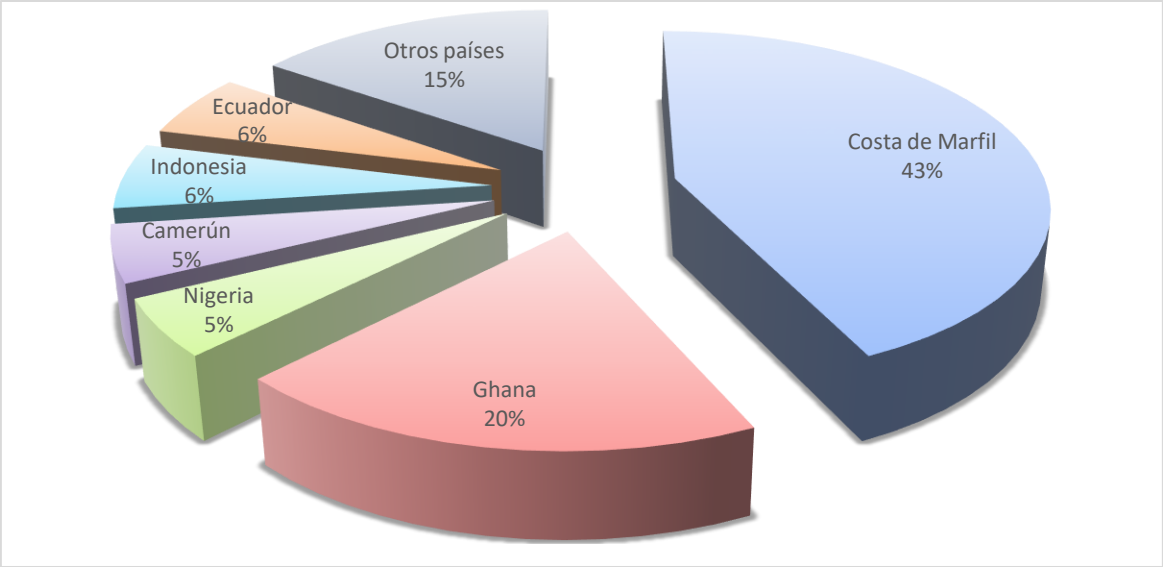


Figura 2. *Países potenciales productores de cacao a nivel mundial*
Fuente: (43)

2.2.3. Producción nacional de cacao.

En Ecuador la producción de cacao es liderada por la región Costa (85%), seguido por las regiones Sierra (11%) y Amazónica (4%). Las principales provincias productoras de este fruto son Guayas (28%), Manabí (13%) y Los Ríos (23%); seguido por pequeñas explotaciones en Esmeraldas (10%), El Oro (5%), Cañar (4%), Sucumbíos (4%) y Santo Domingo de los Tsáchilas (3%) como se muestra en la Figura 3.

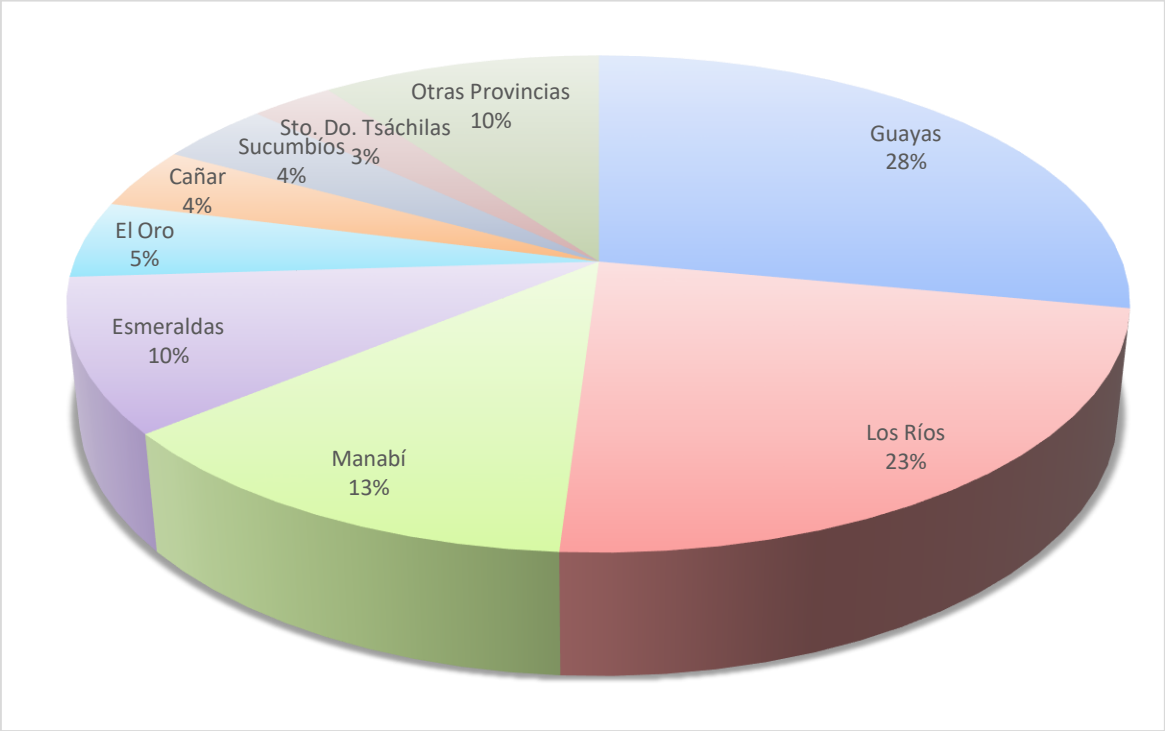


Figura 3. *Producción de cacao en Ecuador en el año 2015*
Fuente: (46)

En el país, el cacao es conocido como la "pepa de oro", porque durante varios siglos dominó la generación de divisas, antes del boom petrolero; dando lugar al aparecimiento de los primeros capitales y desarrollando sectores importantes como la banca industrial (47)**.**

Hoy en día, la mayor parte de la producción del cacao ecuatoriano corresponde a una mezcla del cacao complejo Nacional x Trinitario, Trinitario y Forastero. En el caso del cacao Nacional puro, su superficie de cultivo tiende a desaparecer; puesto que las plantaciones existentes son poco productivas.

2.2.4. Variedades de cacao.

A nivel agronómico existen diferentes variedades, híbridos y clones de cacao; siendo las variedades de mayor significancia las del tipo Criollo, Forastero, Trinitario, complejo Nacional x Trinitario (fino y de aroma) y CCN-51.

2.2.4.1. Cacao Criollo o Nativo.

El cacao Criollo o nativo corresponde a una planta de poco vigor y bajo rendimiento, destacándose por la alta calidad de sus semillas. Esta variedad es cultivada originalmente en las selvas húmedas de México, América Central y el norte de América del Sur. Este tipo de cacao se caracteriza porque sus mazorcas son de forma alargada, superficie rugosa, sin depresión en el cuello y con terminación en punta recta o curva (Figura 4). Los frutos son de color rojizo con hendiduras de color verde cuando están inmaduros y alcanzan tonalidades amarillas con tendencia al rojo cuando maduran. Poseen un cotiledón de color entre marfil parduzco y castaño muy claro. Sus almendras son planas y de forma esférica, con cáscaras finas; se caracterizan por su sabor aromático, olor de cacao dulce y amargo; con un alto contenido de manteca y aceites esenciales que le dan atributos de calidad (26,48)**.**

Figura 4. *Cacao Criollo*
Fuente:(49)

2.2.4.2. Cacao Forastero.

El cacao forastero también es conocido como Amazónico, debido a que se distribuye geográficamente de forma natural en la cuenca de ese río y sus afluentes de América del Sur. Por sus ventajas en el rendimiento y a la resistencia a las enfermedades es la variedad que más abunda, a nivel mundial con el 80% de la producción. A nivel sensorial, se caracteriza por un

sabor muy fuerte a chocolate, además de notas amargas. Su mazorca es de apariencia amelonada y a veces con un pequeño cuello de botella en la base, de poca rugosidad, su superficie es lisa o ligeramente rugosa, los surcos pocos profundos y cáscara gruesa (Figura 5). Las almendras toman un color amarillo al madurar, son pequeñas, aplanadas y de color morado (4,22,50,51)**.**

Figura 5. *Cacao Forastero*
Fuente:(49)

2.2.4.3. Cacao Trinitario.

El cacao Trinitario es una variedad más resistente y productiva que el cacao Criollo, pero de inferior calidad. Presenta una mayor resistencia a enfermedades y han podido adaptarse mejor a muchos ambientes. Es el resultado del cruce entre el cacao Forastero y Criollo, por lo que, es un híbrido que produce ambos tipos de almendras. Sus frutos inmaduros son rojos y verdes (Figura 6), al madurar se tornan de color anaranjado y amarillo. Las almendras son moradas por su alto contenido de antocianinas y muy variables en su sabor (frutales y florares) (13,26,52)**.**

Figura 6. *Cacao Trinitario*
Fuente:(49)

2.2.4.4. Cacao complejo Nacional x Trinitario.

El cacao complejo Nacional x Trinitario es un tipo de cacao producido en el Ecuador, su fruto varía entre amarillo pálido y amarillo intenso. La cáscara es bastante rugosa, por lo tanto, sus surcos son bien definidos (Figura 7). Tiene similitud o parentesco con el cacao Criollo y Forastero; sin embargo, un estudio realizado mediante marcadores moleculares ha demostrado que este material es diferente a pesar de su parecido. Este fruto es utilizado en repostería internacional para la preparación de chocolates selectos gourmets (16,53).

Figura 7. *Cacao complejo Nacional x Trinitario*
Fuente:(49)

2.2.4.5. Cacao CCN-51.

El cacao de la Colección Castro Naranjal o más conocido como CCN-51, es un material desarrollado en Ecuador por el científico ecuatoriano Homero Castro Zurita (1965). Es el resultante del cruce entre un genotipo de cacao y otra variedad proveniente del Oriente Ecuatoriano (3). Esta variedad es reconocida por su alto rendimiento y resistencia a enfermedades (monilla, escoba de bruja). Este híbrido posee frutos de una coloración rojiza cuando alcanza la madurez, tiene una mazorca alargada con vértices poco profundos (Figura 8). Además, presenta altos contenidos de grasa por lo que presenta nichos de mercado definidos (44,54).

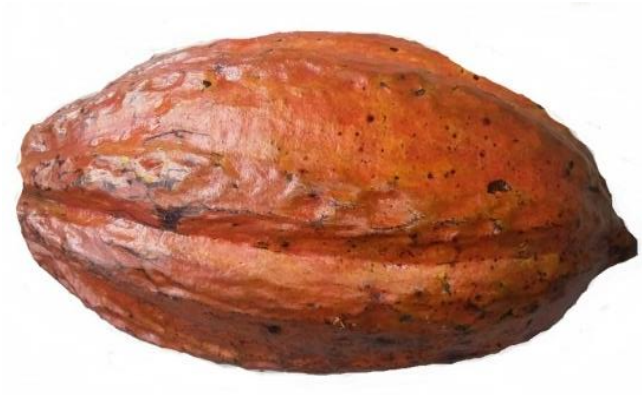


Figura 8. *Cacao CCN-51*
Fuente:(49)

2.2.5. Proceso de post-cosecha del cacao.

Según Vásquez y colaboradores (2019), los frutos del cacao se cosechan después de presentar un índice de madurez adecuada. La principal característica es el cambio de color, cuando la mazorca pasa del color verde o púrpura hacia los colores amarillo, rojo o anaranjado, dependiendo del material o variedad. La recolección se realiza con una tijera de podar especial, cuya finalidad es evitar que las mazorcas sean lastimadas disminuyendo el daño de las semillas. Para la extracción de los granos, el corte se lo realiza de forma transversal o longitudinal en la cáscara o vaina (1,22,55)**.**

Después de la extracción, las almendras de cacao son almacenadas en cajas de madera (laurel, pechiche o chanul), costales o pilas para que se cumpla el proceso de fermentación. Este puede tardar entre 2 y 6 días, dependiendo del tipo de cacao y el método de fermentación. En el primer día, el azúcar de la pulpa se transforma en alcohol, lo que, provoca la pérdida del mucílago que se encuentra adherido a las almendras. Con remoción continua de las semillas, se permite el acceso del aire para provocar la oxidación del alcohol hasta ácido acético. Esto genera un descenso de pH (6,5 a 4,5), el hinchamiento del grano y un cambio en la coloración (lila pálido). Los microorganismos responsables de este proceso son las bacterias ácidos lácticas, acetobacterias, levaduras y hongos filamentosos (26,44,56,57) **.**

Al finalizar la fermentación, las almendras son sometidos a un proceso de secado, durante un tiempo de 3 a 4 días (cacao complejo Nacional x Trinitario) y de 6 a 8 días (cacao CCN-51) hasta obtener una humedad aproximada del 7%; misma que, se puede realizar de manera natural

(sol) o artificial (máquinas de secado). Los granos de cacao después de secarse correctamente, pueden ser almacenados o ingresar directamente al proceso de industrialización para el descascarillado (26,57).

2.2.6. Residuos generados durante la post-cosecha del cacao.

2.2.6.1. Mazorca de cacao.

La mazorca, cáscara o vaina de cacao, es la parte externa que protege al fruto contra condiciones ambientales y plagas; se caracteriza por su forma ovalada, gruesa y rugosa. Presenta un sinnúmero de colores dependiendo de variedad, hibrido o clon, siendo amarillo en el cacao complejo Nacional x Trinitario y anaranjado rojizo en el CCN-51. Para los agricultores cacaoteros, este es un residuo que se obtiene después de la extracción de las almendras y representa entre el 70 y 80% del peso seco de la fruta (1).

Actualmente el aprovechamiento de las mazorcas de cacao está orientado para alimentación de animales de abasto (pollos de engorde), fertilizantes, biogás y biocombustible. En la industria alimentaria se la utiliza como fuente de fibra, obtención de pectina, entre otros. En los últimos años, esta materia prima ha sido reconocida como subproducto valioso de la producción de chocolate, debido a su actividad antioxidante (58,59).

2.2.6.2. Placenta de cacao.

La placenta forma parte del eje central de la mazorca, donde se encuentran unidos los granos de cacao. Su función principal es proveer de nutrientes a los granos de cacao, por esta razón, presenta características químicas similares. La placenta representa alrededor del 5% del peso total de la mazorca. Durante la cosecha y extracción de la semilla, esta es desechada en las plantaciones de cacao en conjunto con las cáscaras; sirviendo de abono en la tierra (56,60).

En la industria alimentaria la placenta se puede utilizar para la extracción de pectina, microencapsulación de compuestos bioactivos y elaboración de galletas. Sin embargo, este residuo se lo destina para la alimentación de animales de abasto (bovinos y aves); mediante la elaboración de balanceados. Además, se lo puede utilizar como abono orgánico (61).

2.2.6.3. Cascarilla.

La cascarilla es la parte externa que cubre la almendra de cacao y después del descascarillado esta biomasa residual se vende como abono agrícola (mantillo). Se compone de una lignina celulósica, especialmente rica en fibra dietética (18–60%). Se lo emplea tradicionalmente en jardinería como materia prima de larga descomposición; actuando como una base de formación de humus. Pero la creciente demanda de productos naturales está impulsando a la industria de alimentos para invertir en la recuperación de compuestos que den lugar a subproductos, como: la fibra dietética, antioxidantes, saborizantes y conservantes a partir de este residuo (1)**.**

2.2.6.4. Mucílago de cacao.

El mucílago es una sustancia viscosa, de color blanco, que está adherida a los granos de cacao. Durante la fermentación la pulpa es removida e hidrolizada por microorganismos; por lo que, esta se derrama en las mismas plantaciones de cacao. El mucílago es necesario para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras, pero una parte de este (5 a 7%) se drena como exudado. El exudado del cacao es un líquido rico en azúcares, enzimas (peptinolíticas), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Pichia fermentans* y *Schizosaccharomyces pombe*) y bacterias (lácticas, acéticas) (1,3,62,63)**.** En la Tabla 1, se reportan los parámetros fisicoquímicos y la composición química de los mucílagos de cacao complejo Nacional x Trinitario y CCN-51.

Tabla 1. *Caracterización fisicoquímica y composición química del mucílago de cacao.*

Parámetros	Complejo Nacional x Trinitario (%)	CCN-51 (%)
Acidez	0,71	0,91
pH	3,70	3,87
Proteína	0,87	0,38
Cenizas	3,96	1,88
Humedad	82,50	80,50
Materia Seca	17,50	19,50
Grasa	0,17	0,13
Sólidos Solubles (°Brix)	15,00	16,00
Densidad	1,044	1,076
Fibra Cruda	0,43	0,41
Sólidos Totales	-	13,50

Fuente: (23,64,65)
Elaborado por: *SIGCHA VERA **;** VALLEJO et al.; ARGÜELLO NOBOA*

2.2.6.4.1. Valorización del mucílago de cacao.

Las grandes cantidades de desechos generados durante la cosecha, post-cosecha e industrialización del cacao, son buenas fuentes de componentes funcionales debido a que poseen compuestos fitoquímicos que se pueden aprovechar. El reprocesamiento de estas biomasas residuales (mucílago), conduce a una mejora de las propiedades funcionales y bioactivas de varios alimentos comerciales. Otorgándole así valor monetario al mucílago de cacao por su venta en los centros de acopio y posteriormente a la disminución considerablemente del desperdicio o desecho de esta materia prima (1,66).

Por su composición química (cafeína, azúcares, alcaloides, aminoácidos y fibra), el mucílago o pulpa de cacao puede ser aplicado en diferentes productos como mermeladas, bebidas alcohólicas y bebidas refrescantes nata (postre en Asia), jugos, batidos, helados y yogurt (3,67). Además, se emplean como un suplemento alimenticio para bovinos, cerdos, peces, pollos y corderos, incorporándose hasta un 20% en los concentrados comerciales. En la agricultura, se emplean en la elaboración de abonos orgánicos tipo compost (44,68).

2.2.7. Valorización de los residuos de cacao.

Durante las últimas décadas, la demanda nacional e internacional de alimentos ha incrementado considerablemente, dando como resultado un conflicto socio ambiental. Por lo que, actualmente existe un mayor interés por el uso de los residuos de la cadena de beneficio del cacao. En el año 2017, se empezó a exportar residuos de cacao desde Costa de Marfil y Sierra Leona hacia España y Malasia, alcanzando un ingreso de 244 millones de dólares. Estas cifras sugieren que existe un interés por parte de las empresas de todo el mundo por aprovechar los residuos provenientes del sector cacaotero para el desarrollo de diversos productos con propiedades benéficas para la salud humana (1,69).

En Ecuador, la cadena de beneficio del cacao produce un alto volumen de residuos como el mucílago y la mayor parte del tiempo es desechado en vertederos, provocando la contaminación del suelo y aguas subterráneas. Además, de la emanación de olores putrefactos (21,22,70). Una forma de mejorar la sostenibilidad de esta importante cadena alimentaria es gestionar adecuadamente la biomasa residual producida a través de la biotransformación de estos

desechos (jaleas, mermeladas, bebidas, pectinas, alcohol, etanol hidratado, extracción de azúcares y agua) (1,44).

Los desechos generados durante la cosecha, post-cosecha e industrialización del cacao, son fuente de macronutrientes y componentes funcionales debido a que poseen grasa, proteínas, fibras, vitaminas, minerales y polisacáridos. En la Tabla 2 se detalla la composición proximal de los residuos de cacao.

Tabla 2. *Composición proximal de los residuos del cacao.*

Composición	Residuos (%)			
	Cáscara		Cascarilla	
	CCN-51	Complejo Nacional x Trinitario	CCN-51	Complejo Nacional x Trinitario
Humedad	6,72	6,53	7,8	7,31
Proteínas	4,52	4,5	17,13	17,1
Grasas	2,4	2,5	2,22	2,18
Cenizas	8,92	9,01	7,33	7,93
Fibra cruda	33,26	33,78	21,38	21,41
Extracto libre de Nitrógeno	44,18	43,68	44,14	44,07

Fuente: (44)
Elaborado por: *BALLADARES GRAZZO*

2.2.8. Industrialización del cacao.

La industrialización de cacao comprende una serie de etapas de trasformación de las almendras de cacao sin cáscara, cascarilla y mucílago, en productos como chocolate, licor, pasta y manteca de cacao. Para la obtención de licor de cacao las almendras limpias son alcalinizadas y molidas; mientras que, la grasa del licor de cacao se extrae mediante prensado, obteniendo como residuo una masa sólida denominada torta de cacao. Al pulverizar la torta se obtiene el polvo de cacao (71).

Para la elaboración de chocolate se mezcla el licor de cacao, con manteca de cacao, azúcar y leche. Esta mezcla se le realiza un proceso de refinación, amasado (conching) y templado para luego ser depositada en moldes o destinarla a confitería (22,72).

Según diferentes investigadores, solo el 10% de los granos de cacao producido en Ecuador se procesan a nivel local para obtener semielaborados (licor, manteca, torta y polvo de cacao) y el

90% restante se exporta a diferentes países. A pesar de que el país es cacaotero, solo el 1% de los granos son transformados a chocolate (barras, tabletas, bombones, chocolate blanco) por empresas como Nestlé Ecuador S.A, Confiteca C.A, Ferrero del Ecuador S.A, Ecuador Cocoa&Coffee, Ecuacoffee S.A (71).

2.2.9. Antioxidante.

Los antioxidantes son sustancias químicas que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas, evitando la iniciación o propagación de reacciones en cadena, de los radicales libres que dañan las células del cuerpo humano. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia hacia un agente oxidante (73). Los RL se producen mediante reacciones con especies reactivas del oxígeno (EROs); cuya vida media biológica dura apenas microsegundos. Estos tienden a alcanzar la estabilidad química mediante la captación de un electrón de otra molécula estable; convirtiéndola en un radical libre (74,75). El antioxidante al colisionar con el radical libre (RL) le cede un electrón; esto provoca su oxidación y se transforma en un radical libre no tóxico (74).

Estos compuestos contrarrestan los efectos del estrés oxidativo al inhibir o evitar la propagación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), previniendo o reparando los daños que producen estas moléculas (73,76). Los antioxidantes naturales presentes en los alimentos poseen propiedades benéficas al tratar ECNT (77). Dentro de este grupo de compuestos antioxidantes están los polifenoles, carotenoides, antocianinas, y vitaminas.

2.2.9.1. Polifenoles.

Los polifenoles son micronutrientes naturales que están presentes en las plantas como compuestos fisiológicos esenciales, comparten las características de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, por lo que, son considerados antioxidantes importante presentes en los alimentos de origen vegetal. Comprende una amplia familia de moléculas que llevan uno o más anillos, con más de 8000 estructuras conocidas hasta la fecha (Figura 9). Dentro de este grupo de compuestos están moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta moléculas altamente polimerizadas como los taninos. Sin embargo, son

considerados compuestos bioactivos ampliamente difundidos en varios tipos de alimentos como: vino, té verde, uvas, verduras, frutos rojos, café y cacao (30,72,77,78).

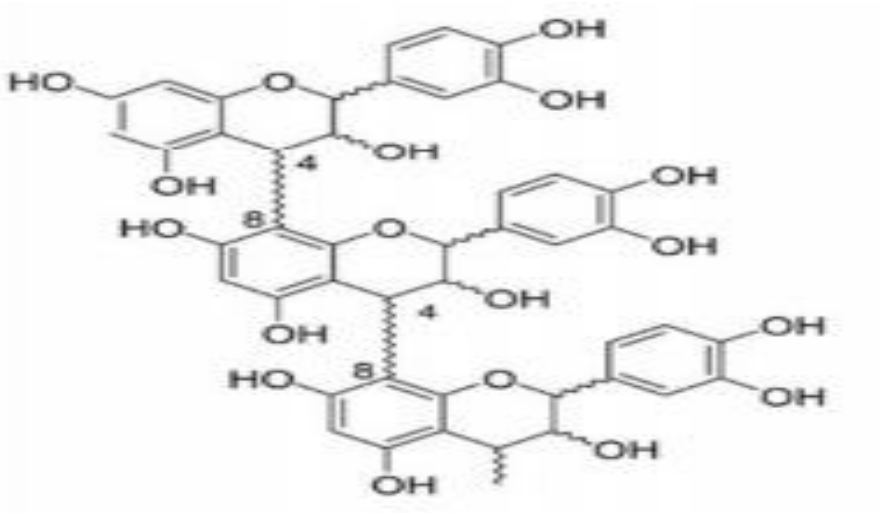


Figura 9. *Estructura química de los polifenoles*
Fuente: (30)

2.2.9.2. Flavonoides.

Los flavonoides, son metabolitos secundarios que forma parte fundamental del crecimiento, regulación y sistema de defensas de las plantas. Constituyen un grupo diverso de más de 9000 estructuras de bajo peso molecular (Figura 10) y moléculas polifenólica. Químicamente están compuestos por dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por un anillo de pirano heterocíclico (anillo C) (79**).** Naturalmente se pueden encontrar presentes en frutas, verduras, café, vino, bebidas. Pueden encontrarse en forma de antocianinas, flavonas, flavonoides e isoflavonas dependiendo de cada fruta o vegetal (30,80,81**).**

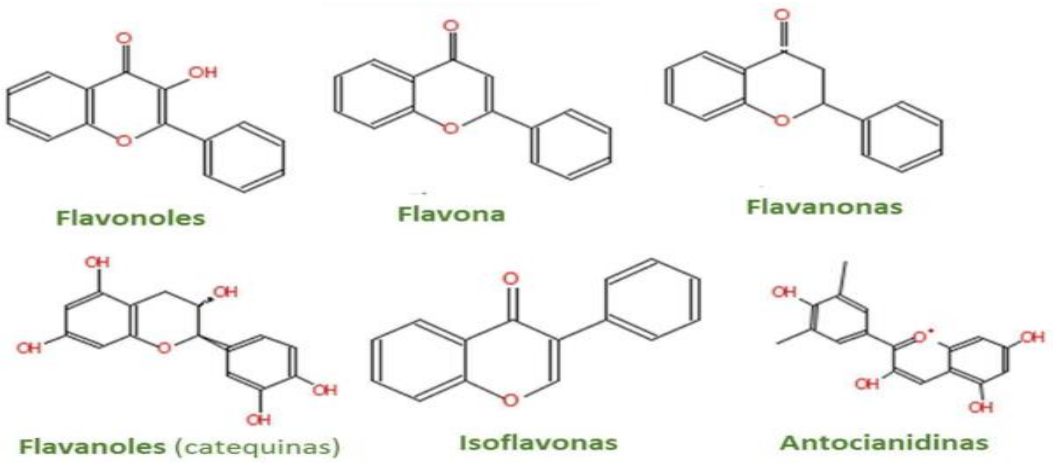


Figura 10. *Estructura química de los flavonoides*
Fuente: (30)

2.2.9.3. Vitamina C.

La vitamina C, también conocida como ácido ascórbico (AA) es un nutriente esencial en muchos organismos multicelulares, especialmente en humanos; puesto que participa en la función inmune y la cicatrización de las heridas, por lo que su consumo genera un efecto positivo en la prevención del daño oxidativo a nivel celular (82)**.** Esta vitamina hidrosoluble se encuentra en cantidades variables en frutas y verduras y su estructura química se presenta en la Figura 11 (80,83)**.**

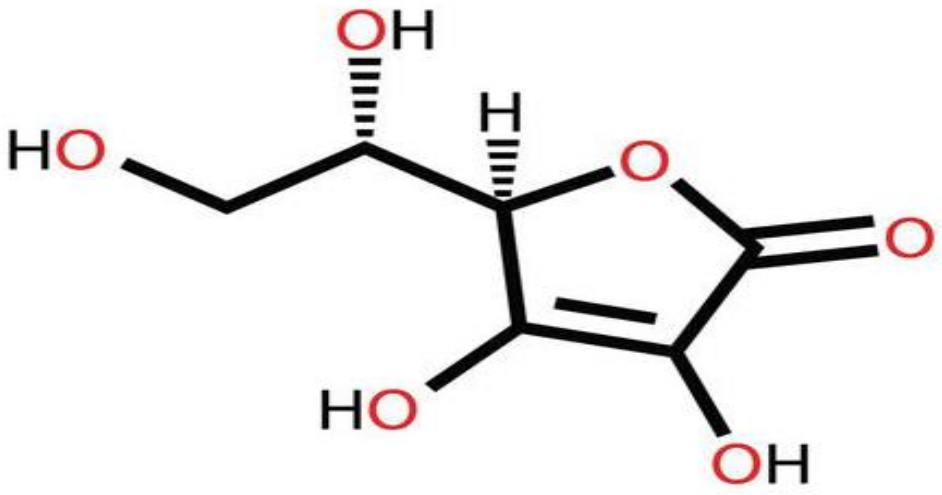


Figura 11. *Estructura de la vitamina C*
Fuente: (82)

2.2.10. Beneficios de los antioxidantes en la salud.

El consumo de antioxidantes juega un papel importante en la salud; dietas deficientes en estos fitonutrientes están vinculadas al desarrollo de diversas enfermedades degenerativas.

La ingesta de antioxidantes en la dieta aporta propiedades antiinflamatorias, inhibición enzimática, actividad antimicrobiana, antialérgica, vascular, antitumoral, estrogénica y citotóxica (79,84)**.** Los polifenoles, flavonoides y vitamina C son los antioxidantes más abundantes en frutas, vegetales y cereales (85)**.** Según diversos estudios de Cory (2018), Guerra (2017) y Serra con colaboradores (2019), el consumo de alimentos con alto contenido de polifenoles como el resveratrol y la catequina, previenen el estrés oxidativo. Mientras que, los flavonoides como la catequina, epicatequina, epigalocatequina e isoflavonas son inhibidores de enfermedades como el Alzheimer y la oxidación del colesterol malo LDL, aumentando el bueno HDL. Además, disminuyen el riesgo de trombosis, enfermedades coronarias, diabetes, absorción de glucosa, regulación del metabolismo, proliferación celular, transporte de glucósidos y glucosa del intestino (78,86,87)**.**

De igual manera, la vitamina C es un antioxidante natural presente en frutas y vegetales que al ser ingerido disminuye el riesgo de diversas ECNT. Estas contribuyen en la erradicación de enfermedades por deficiencias de hierro; favoreciendo su absorción. Además elimina el oxígeno e inhibe la formación de radicales libres de doble enlace donde contrarresta la el daño oxidativo en el sistema nervioso (88,89)**.**

El potencial benéfico de un antioxidante se mide a través de un parámetro denominado capacidad antioxidante o actividad antioxidante por diferentes métodos *in vitro* o *in vivo*.

2.2.11. Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante es una herramienta para evaluar el poder antioxidante de un compuesto puro o biocompuestos esenciales para la salud (90)**.** Sin embargo, este parámetro no debe concluirse en base a un solo método de prueba. Estos varían en diferentes aspectos, por eso es difícil comparar completamente un método con otro (19)**.** En base a esta información se realizó una revisión de diferentes métodos para medir la actividad antioxidante.

2.2.11.1. Método $ABTS^+$.

La medición de la capacidad antioxidante por el método del $ABTS^+$ se realiza empleando el método del radical catiónico 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). El principio de la técnica se basa en la decoloración del radical libre ($ABTS^+$) en presencia de compuestos antioxidantes. Durante la reacción química el $ABTS^+$ pasa de color verde azulado a amarillo y el cambio de color se mide a 734 nm por espectrofotometría UV-VIS (91)**.** Antes de iniciar la reacción de óxido-reducción se debe preparar una fuente de radicales con persulfato de potasio o dióxido de manganeso, dando lugar al radical catión $ABTS^+$ (92)**.**

2.2.11.2. Método DPPH.

La determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH, se realiza empleando el radical libre 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl. En este ensayo, el radical cromógeno se reduce cuando se le añade antioxidantes y pasa del color púrpura al amarillo pálido (hidracina). La capacidad reductora de los antioxidantes hacia DPPH puede evaluarse por resonancia de espín electrónico o por espectrofotometría UV-VIS. En este último caso, se mide la disminución de la absorbancia de la solución a una longitud de onda entre 515 y 528 nm (93)**.**

2.2.11.3. Método FRAP.

La actividad antioxidante por el método del Poder Antioxidante de la Reducción Férrica (FRAP, por sus siglas en inglés), se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el complejo de tripiridiltriazina férrica (Fe^3–TPTZ) a complejo ferroso azul (Fe^2–TPTZ), por la acción de antioxidantes donadores de electrones. El color azul resultante de esta reacción determina la cantidad de hierro reducido y puede correlacionarse con la actividad antioxidante de la muestra en estudio a 593 nm (92)**.**

2.2.11.4. Método ORAC.

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) es un método que mide la inhibición antioxidante de los radicales peroxilo de oxidaciones inducidas. En este ensayo, los radicales peroxilo generados a partir de descomposición térmica de AAPH (2,2’-azobis-(hidrocloruro de 2-amidinopropano) reaccionan con fluoresceína, una sustancia

pro-oxidable. Esta reacción da lugar a un producto que puede cuantificarse fácilmente por fluorescencia (93).

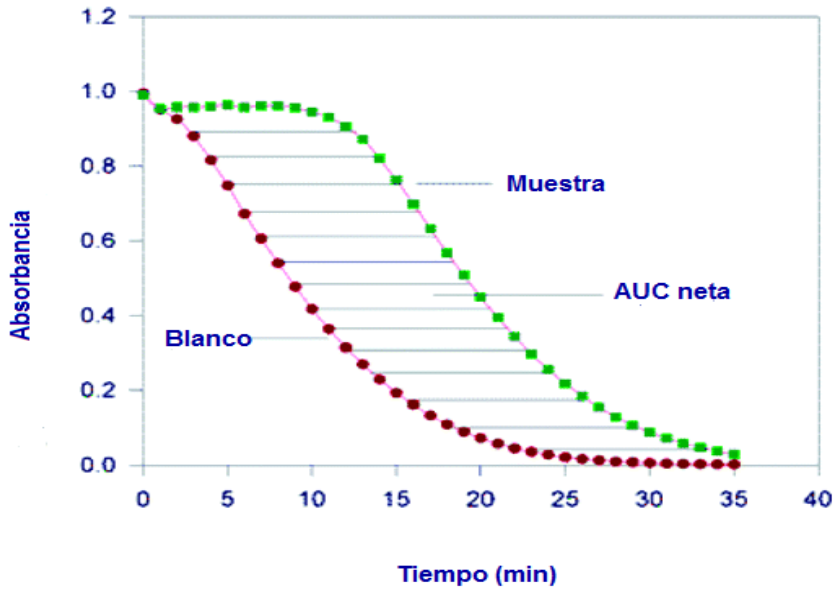


Figura 12. *Área neta bajo la curva (AUC) de la actividad antioxidante por el método ORAC*
Fuente: (94)

Este método mide la actividad antioxidante de la muestra en estudio, por transferencia de átomos de hidrógeno, mediante la disminución de la velocidad y la cantidad de producto formado a lo largo del tiempo (19,95). A diferencia de otros métodos antioxidantes, el ORAC determina el efecto de los antioxidantes más allá de las primeras etapas de oxidación. El cálculo de estos valores se realiza a partir del área neta bajo la curva. Las curvas de decaimiento de la reacción se determinan tomando en cuenta el tiempo de demora, la tasa inicial y el grado total de inhibición en un solo valor (94).

2.2.11.5. Ventajas y desventajas de los métodos más empleados.

En la Tabla 3, se presenta un análisis de las ventajas y desventajas que presenta la aplicación de los diferentes métodos para medir la actividad antioxidante.

Tabla 3. *Ventajas y desventajas de los métodos para evaluar la capacidad antioxidante.*

Método	Ventajas	Desventajas
$ABTS^+$	• Método rápido, fácil de realizar, evita reacciones no deseadas y no requiere de condiciones drásticas. • Se puede solubilizar en forma acuosa y no se ve afectado por la fuerza iónica.	• Los productos pueden tardar mucho hasta llegar al punto final.
DPPH	• Método fácil, preciso, sensible y económico. • Los resultados son altamente reproducibles y comparables a otros métodos de barrido.	• Los radicales interactúan con otros radicales, también sensibles a bases y solventes, • Necesita el uso de solventes orgánicos. • Puede reaccionar con oxígeno en presencia de luz y disminuir su absorbancia.
FRAP	• Es simple, rápido, económico. • No requiere equipo especializado. • Se puede realizar por métodos manuales.	• La capacidad reductora medida no necesariamente refleja actividad antioxidante. • No puede detectar compuestos que actúan por radicales de transferencia de hidrógeno.
ORAC	• Es superior a otros métodos de capacidad antioxidante por que combina tiempo de inhibición y grado de inhibición de radicales libres por un antioxidante. • El Procedimiento es específico para antioxidantes y es sensible, preciso y robusto.	• Mide actividad antioxidante hidrofílica contra radicales peróxilo y antioxidante total. • El principal inconveniente es el deterioro oxidativo.

Fuente: (84,86)
Elaborado por: *KARADAG et al.; PISOSCHI; SINGH*

2.2.12. Microencapsulación de compuestos bioactivos.

La encapsulación es una técnica utilizada para atrapar y proteger un agente activo dentro de otra sustancia. Dicha sustancia es llamada material de pared o agente de recubrimiento, que funciona como portador y/o estabilizador. La microencapsulación se puede considerar como una solución adecuada cuando se trata de proteger compuestos antioxidantes de condiciones ambientales adversas (96,97)**.**

2.2.12.1. Microencapsulación mediante secado por aspersión.

El secado por aspersión o pulverización es la técnica más común en la industria alimentaria. Por medio de una cámara de secado se realiza la atomización de una emulsión, empleando una corriente de aire caliente. El agua de la emulsión se evapora súbitamente, permitiendo así que el producto activo quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. El secado ocurre durante la caída de la mezcla en el fondo de la cámara por contacto con el aire de secado que fluye en contracorriente. Este método es ideal para materiales muy volátiles y sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 segundos) (40)**.** Los materiales de pared más comunes son: maltodextrina, goma arábiga y almidón modificado (98)**.**

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

El proceso de análisis fisicoquímico y funcional del mucílago y microencapsulado se realizó con la colaboración de diferentes instituciones, cuya localización se detalla a continuación:

Tabla 4. *Localización del trabajo experimental.*

Investigación	Localización
Preparación de la muestra	• Recolección y fermentación: Asociación de Agricultores "La Cruz", Mocache, Los Ríos.
Análisis fisicoquímico y antioxidantes	• Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Mejía, Pichincha.
Microencapsulación	• Laboratorio de Análisis y Control de Alimentos, Ambato.

Elaborado por: *Zhunio, 2020*

3.2. Tipo de investigación.

Para la ejecución del proyecto se aplicó investigación exploratoria y cuantitativa, misma que permitió evaluar las características fisicoquímicas y funcionales del mucílago.

3.2.1. Investigación Exploratoria.

La investigación de carácter exploratoria se empleó con la finalidad de proporcionar una visión general sobre el objeto de estudio, de manera tentativa o aproximada. Se escogió dicha investigación porque es de utilidad cuando no existe muchas referencias y bases científicas acerca de un determinado tema; permitiendo recaudar datos o información para reconocer, ubicar y definir el problema así como el desarrollo de metodología de investigación (99)**.**

3.2.2. Investigación cuantitativa.

Con el análisis o la aplicación de herramientas estadísticas como medidas de tendencia central (media, desviación estándar y coeficiente de variación) se realizó mediante investigación cuantitativa con la finalidad de examinar los datos de manera científica (100).

3.3. Métodos de la investigación.

3.3.1. Método inductivo-deductivo.

Para la realización del presente trabajo de investigación se aplicó el método inductivo-deductivo, puesto que, para la obtención de los resultados se partió de un problema como la acumulación de residuos provenientes de la cosecha, post-cosecha e industrialización del cacao. Este método permitió trabajar en la búsqueda de soluciones para el aprovechamiento industrial del mucílago de cacao a través de la búsqueda de alternativas tecnológicas para la obtención de compuestos bioactivos de alta actividad antioxidante. En relación a la idea anterior se buscó brindar conocimientos y facilidad tecnológica adecuada para el análisis fisicoquímico del mucílago (16).

3.3.2. Métodos estadísticos.

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó un software libre, mediante el cual se realizó la comparación de los resultados de investigación.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se empleó fuentes de recopilación de información de tipo primarias y secundarias como se detalla a continuación:

3.4.1. Fuentes Primarias.

Las fuentes primarias de información que se emplearon en el desarrollo de este trabajo de investigación estuvieron compuestas por trabajo de campo y pruebas de laboratorios a través de:

- Recolección de mucílagos en proceso de fermentación (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario)
- Pre-ensayos
- Caracterización fisicoquímica y funcional

3.4.2. Fuentes secundarias.

Las fuentes secundarias de la recopilación de la información sirvieron para la obtención de material bibliográfico referencial, a través de estos recursos bibliográficos se pudo plantear el desarrollo metodológico de la investigación, así como el análisis e interpretación de resultados a través de diferentes fuentes bibliográficas como:

- Libros
- Artículos Científicos
- Revistas Científicas
- Tesis Doctorales
- Trabajos Fin de Máster
- Tesis de Pre-grado

3.5. Diseño de la investigación.

La evaluación del efecto de la variedad de procedencia del cacao sobre la actividad antioxidante de mucílago en proceso de fermentación de las variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario se realizó mediante la prueba "t" de Student y correlación de Pearson. Planteándose las siguientes hipótesis experimentales:

- $\mathbf{H_0}$**:**$\mu_{1=}\mu_2$ H_0: No existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) en la actividad antioxidante del mucílago de cacao .

- $\mathbf{H_1}$**:**$\mu_{1\neq}\mu_2$ H_1: Existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) en la actividad antioxidante del mucílago de cacao.

Para la obtención de resultados confiables, se realizó la cuantificación de la actividad antioxidante con una repetitividad de tres réplicas por cada variedad de mucílago de cacao en

proceso de fermentación. Dichas determinaciones se realizaron a un nivel de confianza de 95% ($\infty = 0{,}05$).

3.5.1. Esquema del ANDEVA.

En la Tabla 5 se presenta el esquema del ANDEVA para la prueba "t" de Student de dos muestras emparejadas. Mediante el estadístico "t" de Studen, se evaluó el efecto de la variedad de cacao en la actividad antioxidante de las muestras de mucílago en estudio.

Tabla 5. *Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) en el contenido de actividad antioxidante en mucílago de cacao.*

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

Elaborado por: *Zhunio, 2020*

3.5.2. Análisis de correlación.

Para determinar los compuestos antioxidantes responsables de la capacidad antioxidantes de las muestras de mucílago de cacao en proceso de fermentación, se aplicó la matriz de correlación de Pearson (Tabla 6), a través del coeficiente de correlación de Pearson se identificó el grado de correlación que existe entre la Procianidina B1, Procianidina B2, Procianidina C1, Epicatequina,

Catequina, Cafeína y Teobromina con la actividad antioxidante *in vitro* de las muestras estudiadas. Para esto se empleó, la información obtenida por Arreaga (2020) referente al estudio de: Identificación de perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario (101).

Tabla 6. *Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas.*

Compuestos fenólicos	Actividad Antioxidantes		
	* ABTS$^+$ (*x*)	**FRAP (*y*)	***ORAC (*z*)
Procianidina B1(*t*)	r_{tx}	r_{ty}	r_{tz}
Procianidina B2 (*u*)	r_{ux}	r_{uy}	r_{uz}
Procianidina C1(*v*)	r_{vx}	r_{vy}	r_{vz}
Epicatequina (*w*)	r_{wx}	r_{wy}	r_{wz}
Catequina (*x*)	r_{xx}	r_{xy}	r_{xz}
Cafeína (*y*)	r_{yx}	r_{yy}	r_{yz}
Teobromina (*z*)	r_{zx}	r_{zy}	r_{zz}

***** *ABTS$^+$ (decoloración del catión radical ABTS).*
******FRAP (poder antioxidante reductor férrica).*
*******ORAC (absorción de radicales de oxígeno).*
Elaborado por: *Zhunio, 2020*

3.6. Instrumentos de la investigación.

Los instrumentos que se aplicó para el desarrollo de la presente investigación fueron los siguientes:

3.6.1. Muestreo.

Para la obtención de las muestras del mucílago de cacao se realizó la recolección seleccionando al azar las frutas de las variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario con un índice de madurez comercial. Para el muestreo en el mes de febrero (época de invierno) se escogieron árboles de la colección de la Asociación de Agricultores “La Cruz” del cantón Mocache, provincia de Los Ríos. Posteriormente se procedió con el beneficio del cacao y durante la etapa de fermentación se fue recolectando el mucílago de cacao de cada una de las variedades por separado. Las unidades experimentales estuvieron constituidas de 45 kg de cacao en baba (almendra y mucílago) de cada variedad.

3.6.2. Manejo de post-cosecha.

El proceso post-cosecha (beneficiado) de las muestras de cacao se realizó en la Asociación de Agricultores “La Cruz”, ubicado en el cantón Mocache provincia de Los Ríos. Los frutos se abrieron con la ayuda de un machete y se extrajeron los granos recubiertos de mucílago, formando una masa de 45 kg por cada variedad, luego fueron fermentadas en cajas (Anexo 2) de madera blanca de laurel (dimensiones 100 cm alto x 100 cm ancho x 95 cm profundidad), dispuestas en forma de escalera de tres renglones (pisos). Cada caja con una capacidad de 150 kg de masa. El proceso de fermentación de las almendras de cacao se realizó durante cuatro días (96 horas) para cacao complejo Nacional x Trinitario (2 días cajón superior, 1 día cajón intermedio y 1 día cajón inferior) y 6 días (144 horas) para cacao CCN-51 (2 días en cada cajón), con remociones cada 24 horas y un volteo de la masa cada 48 horas (102,103).

Durante este proceso, se recogió el mucílago en proceso de fermentación (2,39 Kg de CCN-51 y 1,58 Kg de complejo Nacional x Trinitario) que es eliminado por la base de cada caja, en recipientes herméticos aislados de la luz y el oxígeno. Posteriormente, cada muestra fue llevada a un proceso de congelación (-18°C) garantizando la temperatura mediante un termostato digital para su posterior utilización (104).

3.6.3. Preparación de las muestras.

Para la ejecución de las determinaciones analíticas, las muestras de mucílago de cacao en proceso de fermentación fueron previamente descongeladas a temperatura ambiente (18 °C), en ausencia de luz y oxígeno, para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos.

3.6.4. Extracción de compuestos bioactivos.

Las muestras de mucílago de cacao, se le realizó diferentes pruebas a partir de las cuales se determinó que las medidas analíticas deben realizarse en muestras de cacao en proceso de fermentación (dentro de las 24 primeras horas de fermentación). Para esto el mucílago se sometió a un proceso de centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos con ayuda de una centrifuga SIGMA (modelo 4-16Ks, Alemania). El sobrenadante obtenido fue empleado para las determinaciones de la capacidad antioxidante por diferentes métodos.

3.6.5. Determinación de capacidad antioxidante.

3.6.5.1. Validación de los métodos.

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

3.6.5.2. Linealidad.

Mediante la linealidad se determinó la capacidad de los métodos empleados para dar una respuesta simétrica a la concentración del analito. Para esto se elaboró curvas de calibración de Trolox durante 3 días en intervalos 0 a 800 μM •L^{-1} para $ABTS^+$, 0 a 700 μM• L^{-1} en el método FRAC y 0 a 700 μM• L^{-1} para ORAC. A partir de las concentraciones definidas (X) y el promedio (n=3) de las lecturas de absorbancia (Y) se obtuvieron las curvas de calibración (105).

La validación de las curvas se realizó en base a un estudio de regresión lineal, en el cual se determinaron parámetros como la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r^2) y el intercepto (a). Para las concentraciones medidas (μM• L^{-1}) se estableció como criterio de aceptación cualitativo un $r^2 \geq 0,99$.

3.6.5.3. Límites de detección y cuantificación.

Para la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizaron doce mediciones del blanco o testigo reactivo (que estuvo compuesto por todos los reactivos menos la muestra), de acuerdo a las recomendaciones establecidas en la guía técnica de validación de métodos (Sandoval, 2010). A partir de estas mediciones se establecieron el promedio y la desviación estándar (DS). Para el cálculo del LD se estableció la absorbancia promedio del blanco más tres DS (blanco+3DS). En el caso del límite de cuantificación se expresó como la absorbancia promedio del blanco más seis DS (blanco+6DS). El LD y el LC constituyen la cantidad mínima que puede detectar y cuantificar el método con exactitud y precisión (105,106).

3.6.5.4. Precisión.

La precisión del método se ajustó a través de un ensayo de repetibilidad, para esto se analizó una muestra de la variedad CCN-51 con cuatro réplicas, bajo las mismas condiciones de ensayo

(analista, laboratorio y equipo) siguiendo la metodología establecida para el estudio, en un mismo día. A partir de las mediciones se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (106). Con los resultados se verificó que el método tenga la precisión adecuada para el nivel de concentración medida (µM Trolox• mL^{-1}) utilizando la ecuación de Horwitz ($CV_{Horwitz}$). Este parámetro es utilizado para la validación de ensayos interlaboratorios, y se relaciona el CV en función de la concentración del analito, como se muestra en la Figura 13, también conocida como trompeta de Horwitz (105).

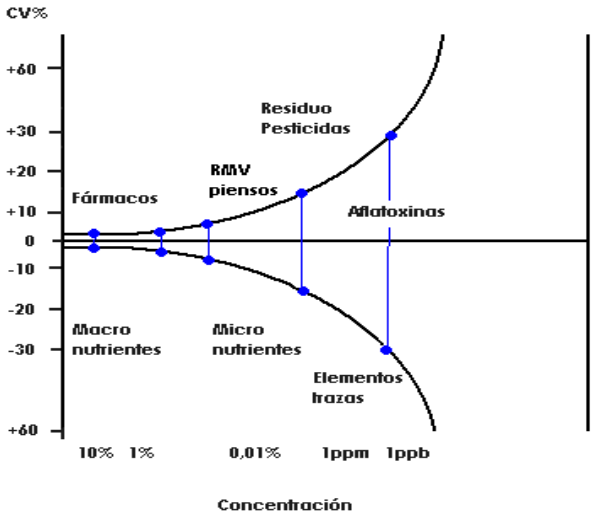


Figura 13. *Trompeta de Horwitz*
Fuente: (106)

Para las concentraciones evaluadas (µM Trolox• mL^{-1}), se aceptó $CV_{Horwitz} \leq 16\%$ por considerarse elementos trazas.

3.6.5.5. Cuantificación.

3.6.5.5.1. Actividad antioxidante $ABTS^+$.

La determinación de la actividad antioxidante del mucílago de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario), se realizó por el método de decoloración del catión radical $ABTS^+$, mediante el método desarrollado por Re y colaboradores (1999), con unas ligeras modificaciones. Para esto se preparó una fuente de radicales empleando disolución de persulfato de potasio (2,45 mM) y disolución de $ABTS^+$ (7 mM) en una relación 1:1 y se dejó reposar por 16 horas a temperatura ambiente y oscuridad. A partir de la fuente de radicales se preparó una

disolución de trabajo en una proporción 1:25 con una disolución amortiguadora de fosfatos pH 7,0 (75 mmol• L^{-1} fosfato de sodio monobásico 0,2 mol• L^{-1} y fosfato de sodio dibásico 0,02 mol •L^{-1}**),** hasta obtener una lectura de absorbancia de 1,1 ± 0,01 a 734 nm (107).

Para la determinación de la actividad antioxidante se transfirió en un tubo de vidrio un volumen de 200 µL de extracto bruto (mucílago de cacao centrifugado) debidamente diluido con 3800 µL de la disolución de trabajo. Con ayuda de un agitador (Vortex Multimixer LAB-LINE INSTRUMENTS.) se homogenizó los tubos y se dejó reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó por espectrofotometría UV-VIS (Espectrofotómetro Shimadzu 2200; Tokio, Japón) frente a una curva estándar de Trolox (0-800 µmol• L^{-1}). Los resultados se expresan como µM TE• mL^{-1} de muestra.

3.6.5.5.2. Actividad antioxidante FRAP.

La actividad antioxidante de las muestras de mucílago de cacao por el método de FRAP se determinó siguiendo el trabajo propuesto por Ovaizu (1986). Para lo cual se tomó 1 mL de extracto bruto de mucílago de cacao previamente diluido (1:2 y 1:4) y se mezcló con 2,5 mL de solución tampón de fosfatos pH 6,6 (mezcla de solución de fosfato de sodio monobásico 2,4% p/v; en agua bidestilada y fosfato de sodio dibásico 2,84% p/v; en agua bidestilada). A la mezcla se añadió 2,5 mL de la solución de Ferrocianida de Potasio 1% (p/v) y se incubó a 50 °C en una bañó María (Memmert, Schwabach Alemania) durante 20 minutos. Luego de la incubación se añadió 2,5 mL de la solución de Ácido tricloroacético al 10% (p/v), 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de cloruro férrico al 1% (p/v). La disolución obtenida se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad (108).

La cuantificación de la actividad antioxidante se midió a 700 nm por espectrofotometría UV-VIS (Espectrofotómetro Shimadzu modelo 2600, Kioto, Japón) frente a una curva estándar de Trolox (0-700 µmol• L^{-1}). Los resultados se reportan como µM TE• mL^{-1} de muestra.

3.6.5.5.3. Actividad antioxidante ORAC.

La determinación de la actividad antioxidante por el método ORAC, se realizó siguiendo el método reportado por Huang *et* al., (2002). Las medidas analíticas se realizaron utilizando

espectrofluorómetro de microplacas BIOTEK SINERGY^{TM} HT (BMG Labtech, Offenburg, Alemania) con filtros de fluorescencia para excitación (485 nm) y emisión (520 nm), empleando microplacas negras de fondo plano de 96 pocillos (Brand Plates®, Werthein, Alemania).

En las placas se colocó 25µL, tanto de estándares de Trolox como de muestras y se agregó 25µL de buffer pH 7,43. Posteriormente, se colocó la placa dentro del soporte del espectrofluorómetro y se procedió a iniciar en el análisis. Automáticamente, el equipo va añadiendo 150 µL de la fluoresceína (17,7nM), después de 30 min de incubación (37°C) el equipo fue añadiendo 25 µL de la solución de AAPH (125,92mM). Antes de la medición de la intensidad de fluoresceína la placa se agitó (15s), y empezó a registrar las medidas de fluorescencia cada minuto, durante 45 minutos.

A partir de las determinaciones se calculó, el área bajo la curva (AUC) de los estándares y las muestras empleando el software Gen5 Data Análisis. Los valores de ORAC son calculados usando una ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el AUC y se expresan en 0-700 µM TE• mL^{-1} (109).

3.6.6. Microencapsulación.

El extracto bruto del mucílago de cacao fue centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm, recolectando el sobrenadante en un recipiente hermético para su posterior microencapsulación. El proceso de microencapsulación se realizó mediante secado por aspersión (Spray dryer BÜCHI B-290; Alemania), empleando como agente encapsulante maltodextrina (MD/agua en una proporción de 3:5 p/v).

La cantidad de MD utilizada se incorporó en base a la cantidad de sólidos totales (mucílago:MD en una proporción de 1:2) y para su completa solubilización en la mezcla, esta se sometió a agitación constante con ayuda del electroagitador (Thomas scientific; Pensilvania, Estados Unidos). Las condiciones de trabajo para el proceso de encapsulación fueron: temperatura de entrada de 140 ºC y de salida de 80 °C por un tiempo de 15 minutos (40)**.**

3.7. Tratamiento de datos.

Para el tratamiento de datos se utilizó el software libre y se aplicó un ANDEVA para la prueba “t” de Student de dos muestras emparejadas con el propósito de constatar si existe un efecto en

la variedad del mucílago (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) con la actividad antioxidante. Además, mediante los datos obtenidos de la investigación de Arreaga (2020) se realizó el esquema correlación de Pearson que ayudó a conocer el grado de relación de los componentes fenólicos (Procianidina B1, Procianidina B2, Procianidina C1, Epicatequina, Catequina, Cafeína y Teobromina) responsables de la actividad antioxidante en los mucílagos de cacao.

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Recursos humanos.

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

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

3.8.2. Materiales.

3.8.2.1. Materia prima.

- Mucílago de cacao CCN-51
- Mucílago de cacao complejo Nacional x Trinitario

3.8.2.2. Materiales de laboratorio.

- Vasos de precipitación de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
- Tubos de ensayo
- Balones de aforo de 25, 50, 100, 250 y 500 mL
- Probetas de 10, 250, 500 y 1000 mL
- Tubos de centrífuga de 15 y 50 mL
- Espátula
- Termómetro
- Micropipetas 100-1000 µL y 1-10 mL
- Puntas para micropipeta 100-1000 µL y 1-10 mL
- Pisetas
- Gradillas

- Frascos de vidrio color ámbar.
- Microplacas negras

3.8.2.3. 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
- Fosfato de sodio monobásico
- Fosfato de sodio dibásico
- Persulfato de potasio
- Trolox
- Ferrocianida de potasio
- Ácido tricloroacético (10%)
- Cloruro férrico (1%)

3.8.2.4. Equipos.

- Brixómetro
- Congelador
- Balanza analítica
- Estufa de secado
- Baño ultrasónico
- Baño María
- Centrífuga
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Mezclador de gases
- Vortex
- Rotoevaporador
- Multimixer
- Agitadores magnéticos
- Espectrofluorómetro de microplacas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

4.1.1. Validación de los métodos.

La validación de las metodologías para la determinación de la actividad antioxidante detallada en el ítem 3.6.5.1 presentó los siguientes resultados:

4.1.1.1. Linealidad.

Dentro de la validación del método, se realizó el estudio de linealidad de las curvas de patrón Trolox para los métodos; $ABTS^+$, FRAP y ORAC. Para lo cual, se emplearon las medias de absorbancias de las curvas elaboradas en tres diferentes días. Los análisis estadísticos de la linealidad se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. *Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración Trolox para la validación de los métodos de actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC.*

Muestra	Promedio		
	$ABTS^+$	**FRAP**	**ORAC**
Pendiente (m)	0,0013	0,0016	0,4174
ordenada al origen (Lo)	0,1234	0,1018	15,7950
Desviación estándar de la pendiente (Sm)	0,0001	0,0001	0,0119
Desviación estándar de la ordenada (SLo)	0,0234	0,0228	0,2349
Error típico (Sy,x)	0,0292	0,0285	0,2734
Coeficiente de determinación (R^2)	0,9982	0,9980	0,9976
$t_{student}$ calculado	22,73	29,23	36,5
$t_{student}$ tablas	2,57	2,57	2,78
m (mínimo)	0,0012	0,0015	0,3795
m (máximo)	0,0015	0,0018	0,4554
Lo (mínimo)	0,0584	0,0383	15,0476
Lo (máximo)	0,1883	0,1652	16,5425

En función de los resultados presentados en la Tabla 7, se estableció que las curvas de calibración desarrolladas con el estándar de Trolox para los métodos $ABTS^+$, FRAP y ORAC, presentaron coeficientes de correlación (R^2) de 0,9982; 0,9980 y 0,9976, respectivamente. Estos

resultados demuestran que existe una alta correlación lineal entre la concentración del estándar de Trolox (X) y la absorbancia medida en el equipo (Y) ($t_{calculado} > t_{crítico}$) en los métodos de $ABTS^+$ y FRAP, indicando que el 99,8 % de la variabilidad de los datos experimentales pudo ser explicada por los modelos de regresión obtenidos, mostrando un ajuste lineal adecuado ($R^2 \geq 0,99$) en todos los casos (105,106). En el caso del método de ORAC los valores del ajuste se calcularon en base a la concentración de Trolox (X) y el área neta bajo la curva calculada por fluorescencia ($t_{crítico} > t_{calculado}$)

En la figura 14, se presenta las curvas de calibración promedio utilizadas para la cuantificación de la actividad antioxidante de las muestras en estudio.

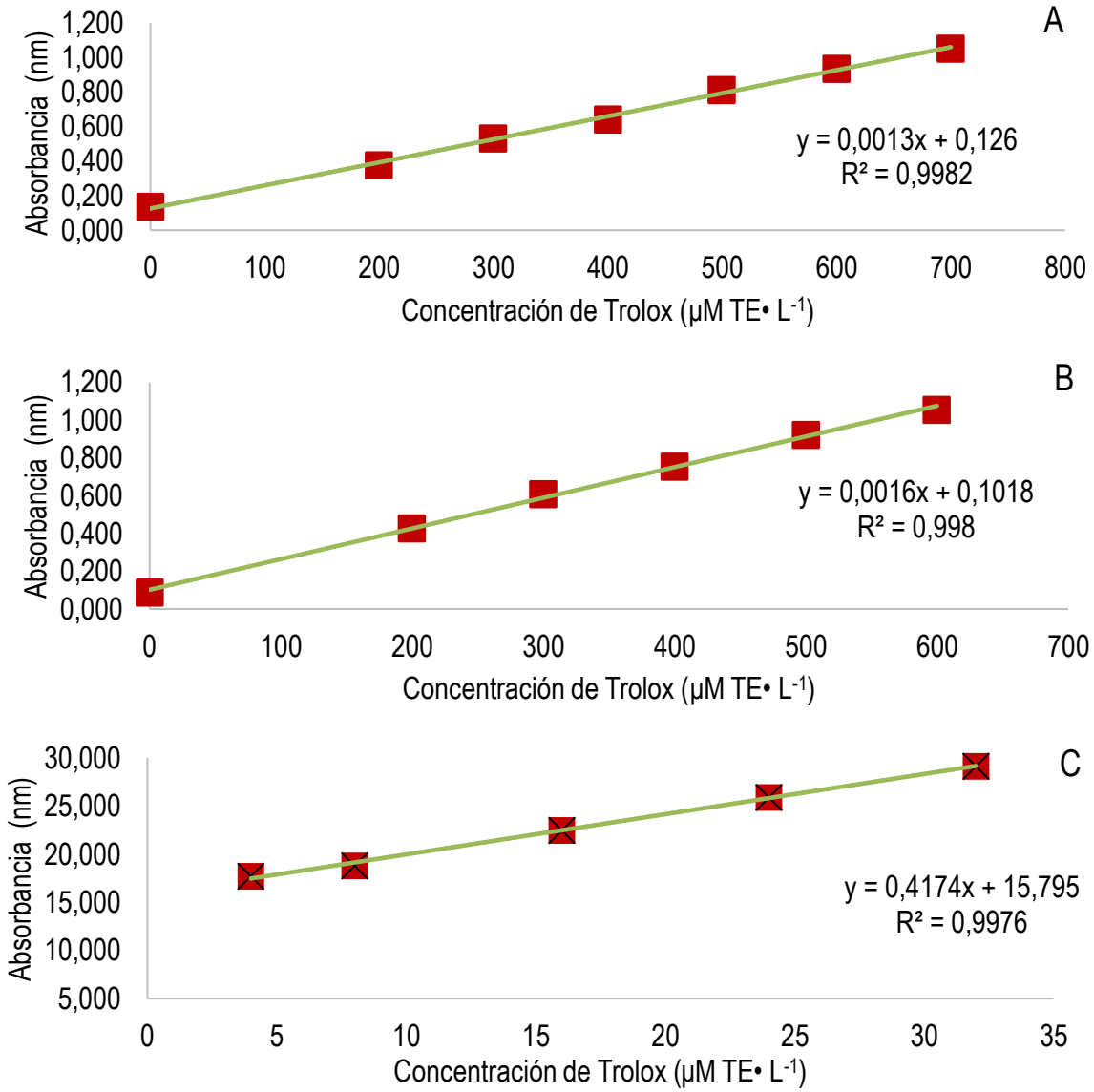


Figura 14. *Curvas de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante por ABTS (A), FRAP (B), y ORAC (C)*

En la Figura 14, se observa la tendencia lineal de las curvas de calibración, las cuales presentaron un coeficiente de correlación lineal (R^2) de 0,998 por lo cual se estableció que existe una alta correlación entre la señal analítica (absorbancia y fluorescencia) y la concentración, comprobándose que el equipo y los analistas proporcionan resultados confiables.

4.1.1.2. Límites de detección y cuantificación.

Con el propósito de establecer la concentración mínima del analito que puede detectar los equipos utilizados, se determinó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) para cada método utilizado para determinar la actividad antioxidante. Estos parámetros (Tabla 8), dependen de la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco, a un nivel de confianza del 95% ($\infty = 0,05$) (105).

Tabla 8. *Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de la actividad antioxidante por ABTS, FRAP y ORAC.*

Parámetros	Promedio		
	$ABTS^+$	**FRAP**	**ORAC**
Límite de cuantificación $\mu M \cdot mL^{-1}$	0,096	0,024	0,012
Límite de detección $\mu M \cdot mL^{-1}$	0,049	0,0077	0,0052

El método $ABTS^+$, presentó un límite de detección de 0,049 $\mu M \cdot mL^{-1}$ (0,01 $mg \cdot mL^{-1}$) y un límite de cuantificación de 0,096 $\mu M \cdot mL^{-1}$ (0,02 $mg \cdot mL^{-1}$). Para el método de ORAC los valores de LD y LC fueron de 0,0052 $\mu M \cdot mL^{-1}$ (0,001 $mg \cdot mL^{-1}$) y de 0,012 $\mu M \cdot mL^{-1}$ (0,003 $mg \cdot mL^{-1}$), respectivamente. De igual manera, los valores de LD y LC obtenidos para el método FRAP fueron de 0,0077 $\mu M \cdot mL^{-1}$ (0,002 $mg \cdot mL^{-1}$) y de 0,024 $\mu M \cdot mL^{-1}$ (0,006 $mg \cdot mL^{-1}$)

4.1.1.3. Precisión de los métodos.

Mediante un ensayo de repetitividad de los métodos de cuantificación de la actividad antioxidante ($ABTS^+$, FRAP y ORAC), se estableció el error experimental de los mismos; para lo cual se evaluó la actividad antioxidante en una muestra con cuatro repeticiones, los resultados se presentan en la Figura 15.

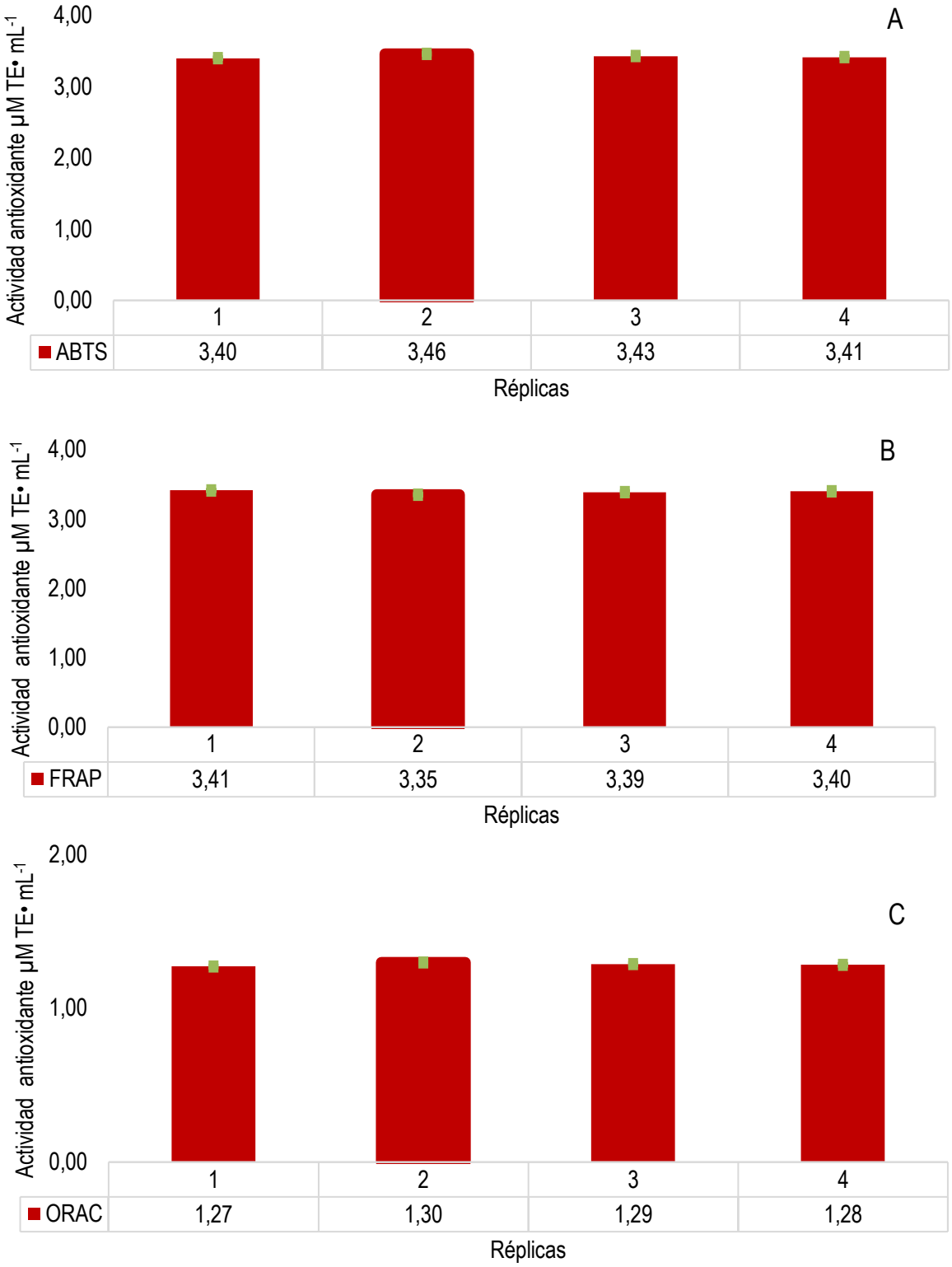


Figura 15. *Repetitividad de los métodos ABTS (A), FRAP (B) y ORAC (C)*

Los datos presentados en la Figura 15, demostraron que la muestra de mucílago de cacao en proceso de fermentación de la variedad CCN-51 presenta una actividad antioxidante que varía entre 3,40 y 3,46 μM• mL^{-1} por el método $ABTS^{+}$; 3,35 y 3,41 μM• mL^{-1} por FRAP y 1,27 a 1,30 μM• mL^{-1} por ORAC. La desviación estándar presentó valores de 0,03 para los métodos de $ABTS^{+}$ y FRAP; siendo menor en el método de ORAC (0,01). Las cuatro réplicas presentaron un coeficiente de variación (CV) inferior al 1%, dentro de los niveles establecidos Horwitz ($CV_{Horwitz} \leq 16\%$) para $ABTS^{+}$ (0,75 %), FRAP (0,78 %) y ORAC (0,85 %). Estos resultados demostraron que lo métodos utilizados para la determinación de la actividad antioxidante presentan una precisión adecuada, por lo cual se encuentran aptos para los análisis propuestos.

4.1.2. Actividad antioxidante.

La actividad antioxidante, comprende una serie de métodos analíticos empleados para estudiar la asociación existente entre la ingestión de compuestos bioactivos (fitonutrientes antioxidantes) y la disminución del riesgo de enfermedades no transmisibles. Estos no nutrientes actúan como agentes reductores, donantes de hidrógeno, inhibidores de oxígeno singlete o quelantes de metales. Cada método empleado para medir la actividad antioxidante tiene su particularidad en relación a los mecanismos de inhibición, por lo que, ningún método refleja la actividad antioxidante total, debiendo emplearse diferentes técnicas *in vitro* (94,110).

Los antioxidantes, actúan como captadores de radicales libres, captadores de agentes oxidantes no radicales, compuestos que inhiben la generación de oxidantes, agentes quelantes de metales de transición y compuestos que pueden estimular la producción de compuestos antioxidantes endógenos. Para lo cual emplean tres mecanismos: transferencia de átomo de hidrógeno (HAT), transferencia de un solo electrón (SET) y la capacidad de quelar metales de transición.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se aplicó tres métodos de cuantificación de la actividad antioxidante *in vitro*: $ABTS^{+}$, FRAP y ORAC; en muestras de mucílago de cacao en proceso de fermentación de las variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario. El FRAP y el ABTS son métodos de transferencia SET cuyos principios son la reducción del complejo tripiridil triazina férrica (TPTZ) y $ABTS^{+}$ por un antioxidante; respectivamente. Por el contrario, el ORAC es un método HAT que determina la capacidad de captación de un radical peroxilo, generado a partir de la molécula orgánica AAPH (95).

Las determinaciones analíticas se realizaron con métodos previamente adaptados y validados en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del INIAP. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.

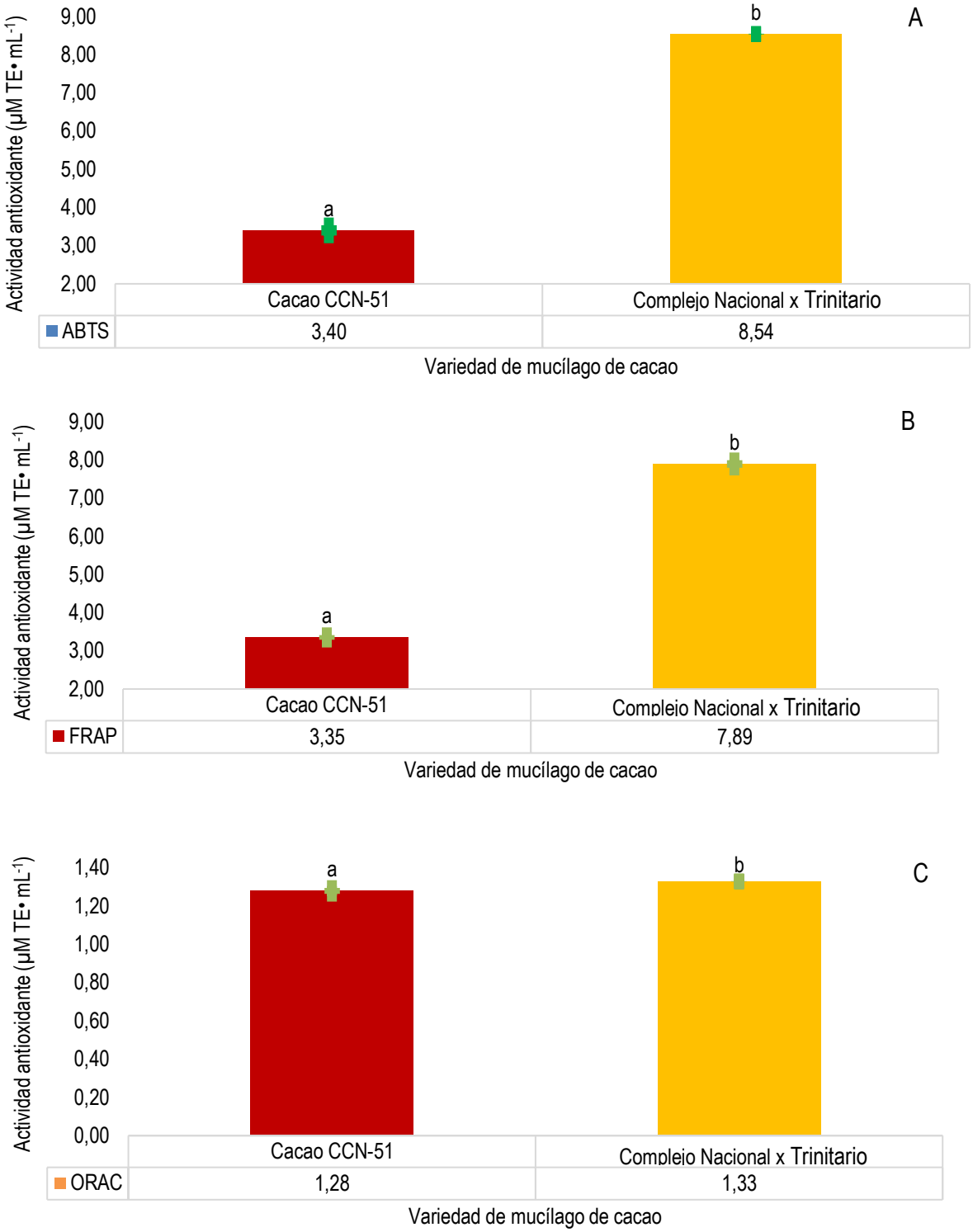


Figura 16. *Actividad antioxidante por los métodos ABTS (A), FRAP (B) y ORAC (C)*

En base a los resultados presentados en la Figura 16, se estableció que el mucílago de cacao CCN-51 presentó un valor inferior de actividad antioxidante con relación al mucílago de cacao complejo Nacional x Trinitario. Las muestras procedentes de cacao CCN-51 presentaron valores de actividad antioxidante de 3,40 y 3,35 μM TE• mL^{-1} para los métodos de $ABTS^+$ y FRAP; mientras que, en las muestras de mucílago de cacao complejo Nacional x Trinitario los valores fueron de 8,54 y 7,89 μM TE• mL^{-1}. Por el método ORAC los resultados obtenidos fueron inferiores a los métodos de $ABTS^+$ y FRAP, con valores de 1,28 y 1,33 μM TE• mL^{-1} en mucílago CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario, respectivamente.

Los resultados demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre las dos muestras de mucílago de cacao; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Evidenciándose que para el método de $ABTS^+$, existe un efecto de la variedad de cacao en la actividad antioxidante del mucílago, con un valor de $p_{calculado}$ (0,0002727667) inferior al valor de $p_{crítico}$ (0,05). De igual manera los resultados obtenidos por los métodos FRAP ($p=0,000289815$) y ORAC (0,000377197), demostraron que existe diferencias estadísticamente significativas ($p_{calculado} < p_{crítico}$) entre las dos variedades de mucílago. La prueba t de student, confirmó que las muestras de mucílago de la variedad complejo Nacional x Trinitario presentan una mayor cantidad de compuestos antioxidantes en los métodos de $ABTS^+$, FRAP y ORAC con un valor $t_{calculado}$ inferior a $t_{crítico}$.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos en las muestras en estudio (Figura 16 A-B) fueron superiores a los resultados obtenidos por Martínez y colaboradores (2012), para mucílago del complejo Nacional *x* Trinitario procedente de los cantones Yaguachi y Naranjal, en la Provincia de Guayas. Estos autores reportaron valores de 4,10 a 4,17 μM TE• mL^{-1} en $ABTS^+$ y 1,74 a 1,97 μM TE• mL^{-1} para FRAP. La diferencia en los resultados obtenidos frente al trabajo de Martínez puede atribuirse a varios factores como el tipo de disolventes empleados en el proceso de extracción y la zona geográfica de procedencia de la muestra. Según varios autores (Guevara et al., 2019; Mazzuti et al. (2018) el resultado de la actividad antioxidante puede estar condicionada por los métodos de extracción utilizados; puesto que, en la mayoría de los casos no se recupera el 100% de los analitos responsables de la actividad antioxidantes (111–113).

En las investigaciones realizadas por Martínez y Endraiyani y colaboradores (2016), se emplearon soluciones de extracción como metanol/acetona y acetona/agua/ácido acético. Sin

embargo, en este estudio se probó que el mucílago es una muestra en proceso de fermentación en la que se encuentran diluidos los componentes antioxidantes, por lo que, en las pruebas analíticas realizadas en este proyecto de investigación se midió la actividad antioxidante de forma directa (113,114).

A nivel bibliográfico, existe muy poca información respecto a actividad antioxidante de mucílago de cacao medida por el método de ORAC. Al comparar los resultados obtenidos con este estudio con el trabajo realizado por Endraiyani y colaboradores (2016), en muestras provenientes de la ciudad de Guayaquil (Ecuador); se observó que la actividad antioxidante de mucílago crudo es superior (1871 μM TE• mL^{-1})a las muestras tomadas de la colección de la Asociación de Agricultores "La Cruz"(114). Según, investigaciones realizadas por Samaniego y colaboradores (2020) en muestras de cacao de diferentes regiones y cantones del Ecuador, se demuestra que existe 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 (103), lo que confirma los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se pudo establecer que los compuestos bioactivos (antioxidantes), generalmente se acumulan en las partes externas de los frutos de cacao (cáscaras, mazorcas, mucílago y placenta) y en otras plantas puede encontrarse en hojas, flores, semillas y tallos, concordando con las investigaciones realizadas por Vriesmann y colaboradores (2011) (115). Por tal motivo, la valorización de la pulpa mucílaginosa ha recibido un creciente interés en la industria alimentaria, con la finalidad de obtener ingredientes, que pueden cumplir con la función de aditivos o suplementos de alto valor nutricional (pectina, azúcares, vitaminas, antioxidantes, etc.) y funcional.

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 (113). En la Tabla 10, se presenta los resultados del análisis de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante medida por $ABTS^{+}$, FRAP y ORAC y los compuestos bioactivos que forman parte del perfil fenólico y metilxantinas presentes en el mucílago de cacao en proceso de fermentación.

Tabla 9. *Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas*

Compuestos fenólicos	Actividad Antioxidante		
	ABTS$^+$ (%)	**FRAP (%)**	**ORAC (%)**
Procianidina B1	99,93	99,99	95,01
Procianidina B2	99,82	99,67	94,89
Procianidina C1	96,97	97,02	92,20
Epicatequina	99,85	99,81	94,49
Catequina	99,95	99,91	94,93
Cafeína	99,79	99,94	94,74
Teobromina	99,87	99,73	94,98

Fuente: (101)
Elaborado por: *ARREAGA (2020)*

Como se muestra en la Tabla 9, la actividad antioxidante del mucílago de cacao en proceso de fermentación medida por el método de ABTS$^+$ mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa ($p<0,05$) con el contenido de compuestos fenólicos y metilxantinas. Es decir, que las Procianidinas B1 (99, 93 %), B2 (99, 82 %) y C1 (99, 97 %), Epicatequina (99, 85 %), Catequina (99, 95 %), podrían contribuir como agentes antioxidantes, cuya función biológica es atrapar |radicales libres (RL) presentes en nuestro organismo (95).

Al igual que en el método de ABTS$^+$, la actividadidad antioxidante del mucílago de cacao en proceso de fermentación medido por FRAP presenta una correlación positivamente fuerte con los compuestos bioactivos ($r\geq99\%$) antes mencionados. En el caso de la Procianidina C1 tiene una correlación menos fuerte (97,02 %) pero no menos importante. Por lo tanto, estos componentes tienen la capacidad de reducir los compuestos metálicos, que en nuestro organismo pueden actuar como prooxidantes; favoreciendo la acción de los compuestos antioxidantes) (94,95).

En el método ORAC el porcentaje de correlación de Pearson fueron inferiores a los obtenidos por los métodos de ABTS$^+$ y FRAP; obteniéndose valores de 95,01; 94,89; 94,49; 94,93 y 92,20% para Procianidina B1, Procianidina B2, Epicatequina, Catequina y Procianidina C1; en ese orden. Sin embargo, dichos componentes fenólicos y metilxantinas tienen la capacidad de

captar radicales peroxilo, unas de las especies reactivas del oxígeno (ROS) responsables del daño de proteínas, ADN, ARN, entre otros (93,95).

A pesar de que se considera que la Teobromina y Cafeína son alcaloides de origen natural con efecto estimulante, se ha demostrado que protegen eficazmente en condiciones de estrés oxidativo. La Teobromina presenta beneficios cardiovasculares como la reducción de la presión arterial y los niveles de colesterol LDL en sangre; además de, efectos antiinflamatorios mediante la supresión de citocinas proinflamatorias (116). Mientras que, la Cafeína es capaz de captar radicales libres reduciendo las formas oxidadas de adenina; por lo que, disminuye el efecto cascada del daño oxidativo (117). Esto explicaría los altos niveles de correlación entre los contenidos de Cafeína y Teobromina con los tres métodos de actividad antioxidante *in vitro*, utilizados en este estudio: $ABTS^+$ (<99, 00 %), FRAP (<99, 00 %) y ORAC (<94, 00 %).

Finalmente, al comparar los resultados de la actividad antioxidante de mucílago de cacao en proceso de fermentación con otros residuos empleados de la industria alimentaria (semillas y pieles de uva) que han sido previamente valorizados, se puede determinar que tanto los residuos de la industria vinícola y aquellos de procedentes de la cadena de beneficio del cacao pueden ser aprovechados como subproductos de la industria agroalimentaria.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se comprobó que existe un efecto de la variedad sobre la actividad antioxidante del exudado de cacao, encontrándose valores superiores en las muestras procedentes de cacao complejo Nacional x Trinitario (8,54; 7,89; 1,33 μM TE• mL^{-1}) que en el cacao CCN-51 (3,40; 3,35; 1,28 μM TE• mL^{-1}) en los tres métodos evaluados ($ABTS^{+}$, FRAP y ORAC).

- El análisis de correlación de Pearson demostró que existe una correlación positivamente fuerte (≥ 99%) de la actividad antioxidante con el contenido de Procianidina (B1, B2 y C1), Epicatequina y Catequina en las dos variedades de mucílago de cacao en proceso de fermentación, evidenciándose que estos componentes son los responsables del valor biológico de las muestras estudiadas.

- De acuerdo con el estudio de validación de métodos, el mucílago de cacao en proceso de fermentación puede valorizarse directamente; sin el uso de soluciones extractantes. Por lo tanto, para el proceso de microencapsulación puede emplearse el sobrenadante líquido del exudado de cacao en mezcla con el agente encapsulante (maltodextrina) para la conservación de los compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante; protegiéndolos de la luz y del oxígeno.

- Dentro de las posibles aplicaciones del mucílago de cacao, se sugiere el aprovechamiento de este residuo en el desarrollo de productos de confitería carentes de propiedades antioxidantes como los sucedáneos de chocolate (chocolate blanco).

- Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación permitieron añadirle un valor agregado a los residuos de la cadena de beneficio del cacao dejando de considerarse un desecho sin valor comercial, para convertirse en un subproducto con características funcionales de interés para la industria agroalimentaria.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar investigaciones acerca de la actividad antioxidante empleando muestras de mucílago de cacao de diferentes variedades, orígenes; así como de muestras comerciales.
- Considerar el estudio de diferentes metodologías para separar el azúcar de los compuestos antioxidantes del mucílago de cacao antes del proceso de microencapsulación.
- Estudiar diferentes métodos de disminución del contenido de agua en los exudados de cacao, con la finalidad de incrementar la concentración de componentes bioactivos en la muestra.
- Realizar un estudio económico con la finalidad de establecer el costo de producción de los componentes bioactivos del mucílago de cacao.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

5.1. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

1. Vásquez ZS, de Carvalho Neto DP, Pereira GVM, Vandenberghe LPS, de Oliveira PZ, Tiburcio PB, et al. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. Waste Manag. 2019;90:72–83.

2. Tapia C. Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad Arriba y CCn51 para la elaboración de una infusión. Universidad Técnica de Ambato. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD; 2015.

3. Teneda Llerena W. Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.): Variedad Nacional y CCN-51. ANDALUCÍA UI DE, editor. Andalucía; 2017. 140 p.

4. Muñoz Hernández GC. Evaluación de la capacidad antioxidante en cacao Nacional fino de aroma (*Theobroma cacao* L.), de las principales zonas productoras del Ecuador. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR; 2018.

5. PRO-ECUADOR. Alimentos frescos, semielaborados y elaborados. 2016.

6. INIAP. Agrociencias, investigación y sostenibilidad. Agrocincias, Investig y sostenibilidad. 2018;19.

7. Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Trends Food Sci Technol. 2018;81(September):172–84.

8. Batista NN, de Andrade DP, Ramos CL, Dias DR, Schwan RF. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. Food Res Int. 2016;90:313–9.

9. Reguillo M. Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. 2018.

10. Rivas Morales C, Leos Rivas C, García Hernández DG. Actividad antioxidante y toxicidad. Investig en plantas importancia médica. 2016;(November 2018):41–76.

11. Naji KM, Thamer FH, Numan AA, Dauqan EM, Alshaibi YM, D'souza MR. Ferric-bipyridine assay: A novel spectrophotometric method for measurement of antioxidant capacity. Heliyon. 2020;6(1):1–6.

12. Anecacao. SECTOR. Sect Export cacao. 2019;1–8.

13. Santana P. Mucílago de cacao (*Theobroma cacao* l.), nacional y trinitario para la obtención de una bebida hidratante. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2017.

14. Delgado N. 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. 92 p.

15. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr HospNutr Hosp. 2012;2727(1):76–8976.

16. Tapia García K. Evaluación del múcilago y placenta de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) aplicando dos métodos conservantes en la obtención de mermelada. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2016.

17. Barros RGC, Andrade JKS, Denadai M, Nunes ML, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. Food Res Int. 2017 Dec 1;102:84–92.

18. Luna Guevara JJ, López Fuentes JM, Jiménez González O, Luna Guevara L. Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión / Microencapsulation of some bioactive compounds through spray drying. CIBA Rev Iberoam las Ciencias Biológicas y Agropecu. 2016;5(10):39.

19. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Vol. 21, Saudi Pharmaceutical Journal. 2013. p. 143–52.

20. Tovar AK, Godínez LA, Espejel F, Ramírez-Zamora RM, Robles I. Optimization of the integral valorization process for orange peel waste using a design of experiments approach: Production of high-quality pectin and activated carbon. Waste Manag. 2019;85:202–13.

21. Kazemi M, Khodaiyan F, Hosseini SS, Najari Z. An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan. Waste Manag. 2019;100:101–11.

22. Perea Villamil JA. El cacao desde la ciencia: de la semilla al chocolate [En Línea]. UIS Primer. Santander UI, editor. Bucaramanga - Colombia: Febrero 2019; 2019. 1–170 p.

23. Sigcha Vera C, Alejandra ZM. Mucílago de cacao (*Theobroma cacao* l .) En la obtención de alcohol etílico. Universidad de las Fuerzas Armadas; 2018.

24. Chafla Moina A. Fermentación en estado sólido de la cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao*) y su evaluación en dietas para cuyes (*Cavia porcellus*) en etapa de crecimiento. UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA; 2016.

25. Ortiz-Valbuena KL, Álvarez-León R. Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas pro piedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguará (Huila, Colombia).

Bol Cient del Cent Museos. 2015;19(1):65–84.

26. Jovellanos Fernandez E. 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. TDR (Tesis Doctorales en Red). UNIVERSIDAD DE MURCIA; 2016.

27. Belwal T, Devkota HP, Ramola S, Andola HC, Bhatt ID. Optimization of extraction methodologies and purification technologies to recover phytonutrients from food. Phytonutrients in Food. Elsevier Inc.; 2020. 217–235 p.

28. Ruiz Larrea M. Breve historia de los radicales libres. Nat Commun. 2018;7:2.

29. Corrales MSc LC, Muñoz Ariza MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova. 2012;10(18):213.

30. Sánchez Sile L. Diseño, desarrollo y evaluación clínica de un producto rico en polifenoles [Internet]. UNIVERSIDAD DE MURCIA; 2015. Available from: http://hdl.handle.net/10201/48023

31. Zhu F, Du B, Xu B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;58(8):1260–70.

32. Ivankovich Guillén S. Enfermedades crónicas no transmisibles como amenaza de muerte prematura. Nutr Humana Diet. 2019;23(3):136–7.

33. González-Morales D, Valencia A, Díaz-Nuñez A, Fuentes-Estrada M, López-Santos O, García-Beltrán O. Development of a low-cost UV-Vis spectrophotometer and its application for the detection of mercuric ions assisted by chemosensors. Sensors (Switzerland). 2020;20(3):5–16.

34. L.C. Passos M, M.F.S. Saraiva ML. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. Meas J Int Meas Confed. 2019;135:2–33.

35. Fuentes Berrio, Lorenzo; Acevedo Correa, Diofanor; Gelves Ordoñez V. Alimentos funcionales: Impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. 2015;13(2):140–9.

36. García P. Técnicas analíticas avanzadas para la determinación de compuestos bioactivos en muestras vegetales. 2016.

37. Marsanasco M, Márquez AL, Wagner JR, Chiaramoni NS, Del V. Alonso S. Bioactive compounds as functional food ingredients: Characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. J Food Eng. 2015;166:55–63.

38. Díaz L. Compuestos bioactivos en cereales y su implicación en la salud. UNIVERSIDAD

COMPLUTENSE; 2017.

39. Figueroa PM, Ceballos MA, Hurtado AM. Microencapsulação por secagem por atomização de óleo de amora (*Rubus glaucus*) extraído com CO2 supercrítico. Rev Colomb Quim. 2016;45(2):39–47.

40. Quinaluisa D. Microencapsulación de componentes bioactivos de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*) mediante secado por aspersión. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD; 2018.

41. Zambrano G. Evaluación de la influencia del proceso de beneficio del cacao (*Theobroma cacao*) CCN-51 de altura en su calidad final, mediante el análisis físico, físico-químico y sensorial. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR; 2018.

42. Vera Chang J, Cabrera Verdezoto R, Veliz Zamora D, Segovia Freire G, Torres Navarrete Y, Pinargote Alava J . Validación de tres métodos de propagación en cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional y Trinitario en Ecuador. Conamti. 2018;5(01):01–6.

43. Alberca Peña YL. Desarrollo de un té con cascarilla de la almendra del cacao (*Theobroma cacao* L.) fino de aroma y CCN-51. 2018.

44. Balladares Grazzo C. Caracterización físico - química de los lixiviados del cacao y café del litoral ecuatoriano, como potenciales fuentes de producción de bioetanol. UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA; 2015.

45. Agrocalidad. Manual de aplicación de buenas practicas agrícolas en cacao. Vol. 1. 2015. p. 1–100.

46. PROECUADOR. Perfil Sectorial de Cacao y Elaborados 2017. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. 2017.

47. Carrasco O. Obtención de harina baja en gluten a partir de la cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA; 2015.

48. Yépez Rivadeneira J. Caracterización del contenido de polifenoles: catequina, epicatequina y procianidinas B1, B2 y C1; en cacao CCN-51 de las principales zonas productoras del Ecuador. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR; 2017.

49. Zhunio B. Cacao criollo, Forastero, Trinitario, Complejo Nacional x Trinitario y CCN-51. 2020.

50. Tenesaca D. Balance energético de la producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao CCN-51 en los cantones Camilo Ponce Enríquez y La Troncal. UNIVERSIDAD DE CUENCA; 2019.

51. Tezara W, Urich R, Jaimez R, Coronel I, Araque O, Azócar C, et al. Does griollo cocoa have the same ecophysiological characteristics as forastero? Bot Sci. 2016;94(3):563–74.

52. Mundaca Vidarte GA. Análisis de la calidad del grano de cacao mediante imágenes hiperespectrales usando técnicas de visión artificial. Universidad de Piura. UNVERSIDAD DE PIURA; 2016.

53. Mata Anchundia D, Suatunces Cuñumai J, Munoz Macías S, Bayas A, Herrera Soler M. Dimensión climática en el comercio justo para el cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* l.). Rev Estud Empres Segunda Época. 2018;2(2):86–102.

54. Torres Murillo M. Cadena de valor para la comercialización de cacao de los productores del recinto Tazone. Vol. 5, Journal of Chemical Information and Modeling. UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE ESMERALDAS DIRECCIÓN; 2016.

55. Egas MA. Evaluación y análisis técnico financiero del proceso de prensado de licor de cacao (*Theobroma cacao*) para la obtención de manteca y polvo de cacao. ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL; 2015.

56. Vanderschueren R, De Mesmaeker V, Mounicou S, Isaure MP, Doelsch E, Montalvo D, et al. The impact of fermentation on the distribution of cadmium in cacao beans. Food Res Int. 2020;127(October 2019):1–9.

57. Guanga S. Estudio y aprovechamiento de los residuos del cacao de la compañía Nestlé como estrategia comercial. Universidad De Guayaquil; 2018.

58. Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Vol. 81, Trends in Food Science and Technology. Elsevier Ltd; 2018. p. 172–84.

59. Lim TK. Theobroma cacao. In: Edible Medicinal And Non Medicinal Plants. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 208–51.

60. Carvajal, Janneth & Vega W. Evaluación de las propiedades nutricionales de la harina del mucílago de cacao con la adición de la placenta, y su utilización en panadería. Chemosphere. UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR Facultad; 2017.

61. Sánchez V, El Salaus A, Yepez M, Mosquera C, Arizaga R, Cadena N. Elaboración de alimento balanceado para pollo broiler a base de subproductos de cacao (cáscara, cascarilla y placenta). Espirales Rev Multidiscip Investig. 2018;2(13):1–13.

62. Morocho K. Hidrólisis enzimática del mucilago de cacao CCN-51 (*Theobroma cacao* l.) Para incrementar la concentración de azúcares fermentables. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA; 2019.

63. Morgan P, Wollman P, Jackman S, Bowtell J. Flavanol-rich cacao mucilage juice enhances recovery of power but not strength from intensive exercise in healthy, young men. Sports. 2018;6(4):1–12.

64. Vallejo C, Díaz Ocampo R, Morales W, Velasco R, Vera J, Baren C. Utilización del mucílago de cacao, tipo Nacional y Trinitario, en la obtención de jalea. Espamciencia. 2016;7(1):51–8.

65. Argüello Noboa AC. Elaboracion de un confite con el exudado del mucílaco de cacao. 2016.

66. Kusch-Brandt S, Mumme J, Nashalian O, Girotto F, Lavagnolo MC, Udenigwe C. Valorization of residues from beverage production. In: Processing and Sustainability of Beverages. Elsevier; 2019. p. 451–94.

67. Kusch-Brandt S, Mumme J, Nashalian O, Girotto F, Lavagnolo MC, Udenigwe C. Valorization of residues from beverage production. Processing and Sustainability of Beverages. Elsevier Inc.; 2019. 451–494 p.

68. Villavicencio D. Desarrollo de helado mantecado a parti de mucilago de cacao (*Theobroma Cacao* L. CCN-51). UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL FACULTAD; 2018.

69. Grillo G, Boffa L, Binello A, Mantegna S, Cravotto G, Chemat F, et al. Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitational reactors. Food Res Int. 2019;115(August 2018):200–8.

70. Nayak A, Bhushan B. An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. J Environ Manage. 2019;233(December 2018):352–70.

71. Acebo M. Estudios industriales y orientación estratégica para la toma de decisiones para la Industria de cacao. Espol. 2016.

72. Teneda Llerena WF, Ah-Hen K, Lemus-Mondaca R. Caracterización de una infusión de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L., var. Arriba) con hierbas aromáticas. Agro Sur. 2017;45(3):47–55.

73. Schilder WH, Tanumihardja E, Leferink AM, van den Berg A, Olthuis W. Determining the antioxidant properties of various beverages using staircase voltammetry. Heliyon. 2020;6(6):e04210.

74. Trujillo Hernández C. Estudio de la actividad antioxidante en hierbas y frutos. UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA MÁSTER; 2019.

75. Al-Farsi M, Al-Amri A, Al-Hadhrami A, Al-Belushi S. Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey. Heliyon. 2018;4(10):1–14.

76. García Alonso FJ. Estimación de la capacidad antioxidante de los alimentos ingeridos por la poblaclión española. 2017;44:1–6.

77. Naspud E. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos alcohólicos del

fruto de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos con tres pretratamientos térmicos. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA; 2018.

78. Serra D, Almeida LM, Dinis TCP. Polyphenols as food bioactive compounds in the context of autism spectrum disorders: A critical mini-review. Neurosci Biobehav Rev. 2019;102(May):290–8.

79. Fusi F, Trezza A, Tramaglino M, Sgaragli G, Saponara G. The beneficial health effects of flavonoids on the cardiovascular system: focus on K+ channels. Pharmacol Res. 2020;104625.

80. Díaz Navarrete S. Estudio de la capacidad antioxidante durante el almacenamiento en refrigeración de naranjilla (*Solanum quitoense*) tratada con radiación UV-C. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL FACULTAD; 2012.

81. Delgado-Andrade C. Editorial overview: Functional foods and nutrition. Curr Opin Food Sci. 2017;14:vii–viii.

82. Drahansky M, Paridah M., Moradbak A, Mohamed A., Owolabi F abdulwahab taiwo, Asniza M, et al. Vitamina C. In: Hamza A, editor. Vitamina C. Ain Shams , Egipto; 2017. p. 1–20.

83. Zambrano Tenezaca J. Caracterización físico química y nutricional de bebida de tomate de árbol con inclusión de cascarilla de cacao. Universidad Técnica de Machala; 2017.

84. Harris T, Jideani V, Le Roes-Hill M. Flavonoids and tannin composition of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) of Mpumalanga, South Africa. Heliyon. 2018;4(9):1–12.

85. González F, Hernández N, Cooper B, Núñez L, Reyes M. Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. Vertientes. 2015;18(1):16–21.

86. Guerra C. Caracterización y microencapsulación de compuestos bioactivos del mortiño (*Vaccinium floribundum*, Kunth). 2017.

87. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. Front Nutr. 2018;5(September):1–9.

88. Bastías Montes JM, Cepero B. Y. La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos. Rev Chil Nutr. 2016;43(1):81–6.

89. Kim HS, Lee SY, Hur SJ. Effects of different starter cultures on the biogenic amine concentrations, mutagenicity, oxidative stress, and neuroprotective activity of fermented sausages and their relationships. J Funct Foods. 2019;52(6):877–87.

90. Zaquinaula F. Determinación de la capacidad antioxidante en alimentos tradicionales. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA; 2016.

91. Singh S, Singh RP. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. Vol. 24, Food Reviews International. 2008. p. 392–415.

92. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for total antioxidant activity determination: A review. Biochem Anal Biochem. 2012;01(01).

93. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Anal Methods. 2009 Mar;2(1):41–60.

94. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53(10):4290–302.

95. Pérez Jiménez J. "Methodology for the evaluation of antioxidant functional ingredientes. Effect of the intake of grape antioxidant dietary fiber on antioxidant status and parameters of cardiovascular risk on humans. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID; 2017.

96. Aprodu I, Milea SA, Anghel RM, Enachi E, Barbu V, Crăciunescu O, et al. New functional ingredients based on microencapsulation of aqueous anthocyanin-rich extracts derived from black rice (*Oryza Sativa* I.). Molecules. 2019;24(18):1–14.

97. Abadiano RLJ. Desarrollo de un ingrediente funcional a partir de pulpa de mora (Rubus glaucus benth) y pulpa de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), mediante la microencapsulación de compuestos fenolicos. ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL; 2015.

98. Sánchez-Madrigal MÁ, Quintero-Ramos A, Amaya-Guerra CA, Meléndez-Pizarro CO, Castillo-Hernández SL, Aguilera-González CJ. Effect of agave fructans as carrier on the encapsulation of blue corn anthocyanins by spray drying. Foods. 2019;8(7):1–18.

99. Niño Rojas V. Metodología de la investigación. Ediciones. Vol. 23, Botanica Marina. Bogotá; 2011. 117–120 p.

100. Llerena Silva WM. Estudio de la relación entre el color y el contenido de antioxidantes de seis frutas tropicales y andinas: Arazá (*Eugenia stipitata*), Mora (*Rubus glaucus*) variedad Iniap Andimora 2013, Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), Naranjilla (*Solanum quitoense*). UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO; 2014.

101. Arreaga Chévez A. Identificación de perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades CCN-51 y Nacional. Universidad Técnica Estatal de Quevedo; 2020.

102. Paredes N. Manual de cultivo de cacao para la Amazonía ecuatoriana. Vol. 76, Manual. Quito; 2009.

103. Samaniego I, Espín S, Quiroz J, Ortiz B, Carrillo W, García-Viguera C, et al. Effect of the growing area on the methylxanthines and flavanols content in cocoa beans from

Ecuador. J Food Compos Anal. 2020;(January):1–31.

104. Samaniego I, Espín S. Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao. San Mateo. Quito; 2016. 1–67 p.

105. Llerena W. Efecto de la aplicación de atmósferas modificadas en la capacidad antioxidante de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh.), naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Universidad Pública de Navarra. UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA; 2018.

106. Sandoval S. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos." Sección Me. Ambiental D de S, editor. Santiago, Chile; 2010. 3–70 p.

107. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Development and characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams. EMPA Act. 1999;26(2007):1231–7.

108. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese J Nutr Diet. 1986;44(6):307–15.

109. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. J Agric Food Chem. 2002;50(16):4437–44.

110. Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ, et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? Food Chem. 2018;264(March):1–5.

111. Mazzutti S, Rodrigues LGG, Mezzomo N, Venturi V, Ferreira SRS. Integrated green-based processes using supercritical CO2 and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compouds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. J Supercrit Fluids. 2018;135(December 2017):52–9.

112. Guevara M, Tejera E, Granda-Albuja MG, Iturralde G, Chisaguano-Tonato M, Granda-Albuja S, et al. Chemical composition and antioxidant activity of the main fruits consumed in the western coastal region of Ecuador as a source of health-promoting compounds. Antioxidants. 2019;8(9).

113. Martínez R, Torres P, Meneses MA, Figueroa JG, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. Food Res Int. 2012;49(1):39–45.

114. Endraiyani V, Ludescher RD, Di R, Karwe M V. Total Phenolics and Antioxidant

Capacity of Cocoa Pulp: Processing and Storage Study. J Food Process Preserv. 2016;41(4):1–6.

115. Vriesmann LC, de Mello Castanho Amboni RD, De Oliveira Petkowicz CL. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. Ind Crops Prod. 2011;34(1):1173–81.

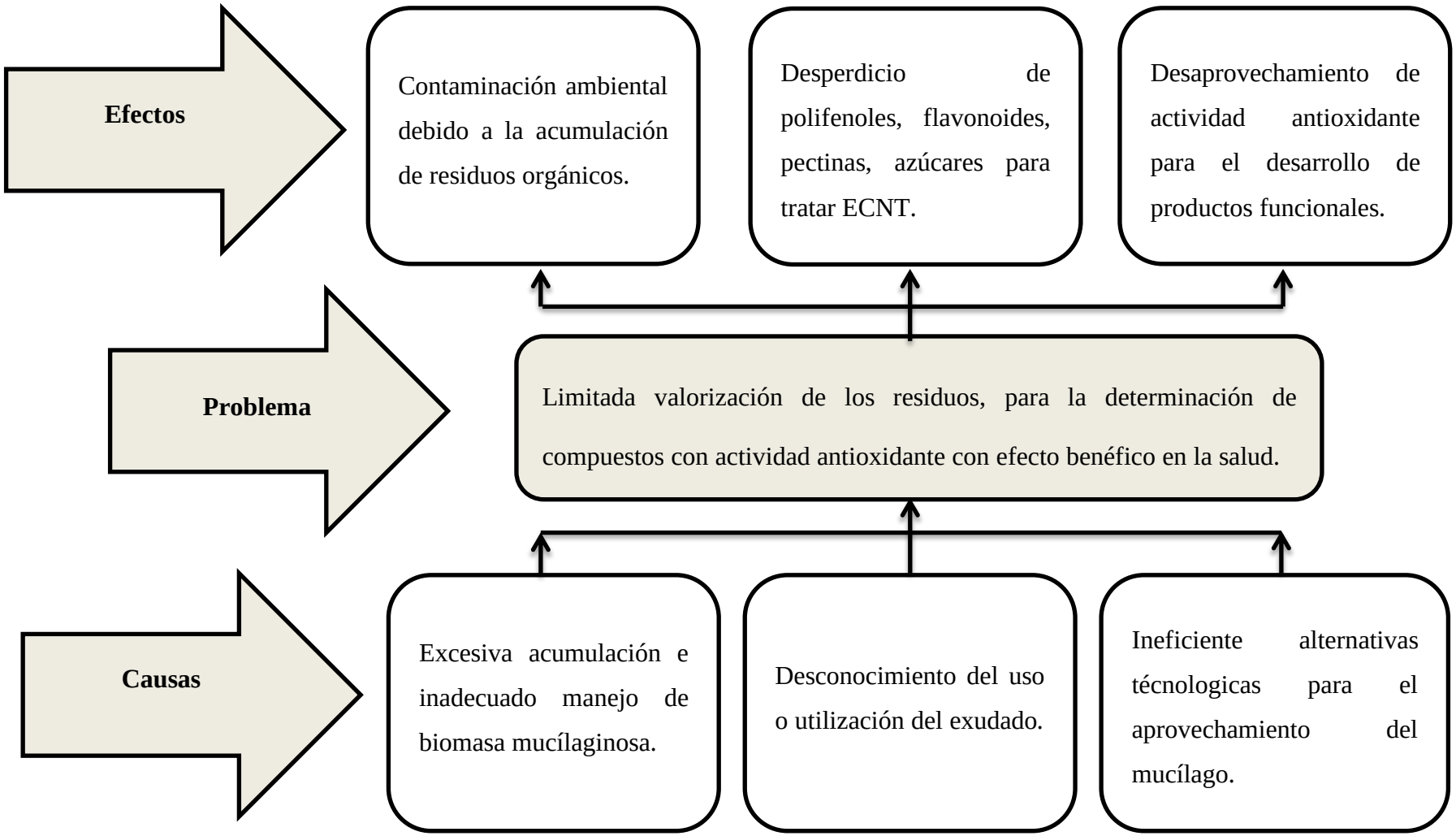
116. Gu R, Shi Y, Huang W, Lao C, Zou Z, Pan S, et al. Theobromine mitigates IL-1β-induced oxidative stress, inflammatory response, and degradation of type II collagen in human chondrocytes. Int Immunopharmacol. 2020;82(September 2019):1–8.

117. Vieira AJSC, Gaspar EM, Santos PMP. Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. Radiat Phys Chem. 2020;174(May):1–6.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 1. Árbol de problemas.



Anexo 2. Proceso de la post-cosecha del cacao.

Cacao CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario.

Beneficiado del cacao CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario.

Cajas de fermentación tipo escalera

Mucílago en Proceso de Fermentación de variedades CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario.

Anexo 3. Extracción de los compuestos bioactivos.

Centrifugación de las muestras de cacao.

Extracto bruto de las muestras de cacao.

Anexo 4. Preparación de los reactivos de ABTS y FRAP.

Homogenización de los Fosfatos ABTS y FRAP.

Dilución de los reactivos de ABTS y FRAP.

Anexo 5. Determinación de la actividad antioxidante por los métodos ABTS, FRAP y ORAC.

Cuantificación de las muestras de los métodos ABTS y FRAP por Espectrofometría UV-VIS.

Cuantificación de las muestras por el método ORAC por Espectrofluorometría.

Anexo 6. Prueba t de Student (dos muestras emparejadas) para los métodos ABTS, FRAP y ORAC.

Parámetros	**Mucílago**	
	Cacao CCN-51	**Cacao complejo Nacional x Trinitario**
Media	3,399854506	8,541893244
Varianza	0,018168696	0,0000747683
Número de observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
Estadísticos t	-62,56804414	62,56804414
P(T<=t) una cola	0,000127673	0,000127673
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	2,91998558
P(T<=t) dos colas	0,000255346	0,000255346
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	4,30265273

Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) en el contenido de actividad antioxidante por el método ABTS.

Parámetros	Mucílago	
	Cacao CCN-51	Cacao complejo Nacional x Trinitario
Media	3,350885591	7,893045203
Varianza	0,003788018	0,009697327
Número de observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
Estadísticos t	-213,0422493	213,0422493
P(T<=t) una cola	0,00001016	0,00001016
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	2,91998558
P(T<=t) dos colas	0,00022032	0,00022032
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	4,30265273

Prueba t de Student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) en el contenido de actividad antioxidante por el método FRAP.

Parámetros	Mucílago	
	Cacao CCN-51	Cacao complejo Nacional x Trinitario
Media	1,278466637	1,327830758
Varianza	0,000244147	0,00000285171
Número de observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
Estadísticos t	-5,890141263	5,890141263
P(T<=t) una cola	0,013817209	0,013817209
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	2,91998558
P(T<=t) dos colas	0,027634418	0,027634418
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	4,30265273

Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y complejo Nacional x Trinitario) en el contenido de actividad antioxidante por el método ORAC.