



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

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

Título de la Unidad Integradora Curricular:

“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE PLACENTA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.), VARIEDADES
CLON CCN-51 Y TIPO NACIONAL x TRINITARIO”.

Autor:

Oscar Alfredo Chumaña Zambrano

Director de la Unidad Integradora Curricular:

Ing. Jaime Fabián Vera Chang, MSc. (UTEQ)

Codirector de la Unidad Integradora Curricular:

Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua, PhD. (INIAP)

Quevedo – Los Ríos - Ecuador

2022



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Chumaña Zambrano Oscar Alfredo, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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

f. _____

Chumaña Zambrano Oscar Alfredo

C.C. # 1207992619



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Los suscritos, **Ing. Jaime Fabián Vera Chang, MSc.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y el **Dr. Iván Samaniego Maigua, Ph. D.**, Investigador del Instituto Nacional de investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de Director y Co-Director de la Unidad de Integración Curricular **CERTIFICAMOS** que el estudiante **Chumaña Zambrano Oscar Alfredo**, realizó el proyecto de investigación de grado titulado **“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PLACENTA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.), VARIEDADES CLON CCN-51 Y TIPO NACIONAL x TRINITARIO”**, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, bajo nuestra dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Jaime Fabián Vera Chang MSc.

**DIRECTOR DE LA UNIDAD
INTEGRADORA CURRICULAR**

Ing. Iván Rodrigo Samaniego Maigua PhD.

**CO-DIRECTOR DE LA UNIDAD
INTEGRADORA CURRICULAR**



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. Jaime Fabián Vera Chang, MSc., y el Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD., investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en calidad de director y Co-Director de la Unidad de Integración Curricular, damos constancia que se ha revisado la Unidad de Integración Curricular titulada **“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PLACENTA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.), VARIEDADES CLON CCN-51 Y TIPO NACIONAL x TRINITARIO”**, realizada por el Sr. Estudiante de la Carrera de Ingeniería en Alimentos Chumaña Zambrano Oscar Alfredo, certificamos que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema **URKUND** es de 3 % el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

Document Information

Analyzed document	V0. Oscar Chumaña_22-Nov-2022.docx (D150647978)
Submitted	11/23/2022 3:57:00 AM
Submitted by	
Submitter email	oscar.chumana2016@uteq.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	wllerenas.uteq@analysis.arkund.com

Ing. Jaime Fabián Vera Chang MSc.

**DIRECTOR DE LA UNIDAD
INTEGRADORA CURRICULAR**

Ing. Iván Rodrigo Samaniego Maigua Ph.D.

**CO-DIRECTOR DE LA UNIDAD
INTEGRADORA CURRICULAR**



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

Título:

**“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE PLACENTA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.),
VARIEDADES CLON CCN-51 Y TIPO NACIONAL x TRINITARIO”.**

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

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Cyntia Yadira Erazo Solórzano, MSc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Vicente Alberto Guerrón Troya, MSc.

Quevedo - Los Ríos - Ecuador

2022

AGRADECIMIENTO

Me siento eternamente agradecido con todas las personas que han sido parte de mi trayectoria y han aportado positivamente mi travesía profesional y mi formación.

Mi familia es el pilar donde se fundamentan mis valores y el temple para continuar avanzando en busca de un futuro mejor. Mi más profundo agradecimiento a mi madre la Sra. Bella Anita Zambrano Vite, mi fuente principal de motivación y gran ejemplo de lucha constante, mi luz. A mi Padre Elvis Elías Chumaña Rojas, ha sido un apoyo e importante en la culminación de este trabajo. A mis hermanos Jessica y Pablo por su vital apoyo y comprensión, gracias totales.

*A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por formar los cimientos de mi carrera profesional a través de valores, sabiduría y profesionalismo impartidos por cada uno de los docentes y autoridades, por su valioso aporte, a través del Proyecto del Fondo competitivo FOCICYT 2020-2021: VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE LA CADENA DE BENEFICIO DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS CON PROPÓSITOS FUNCIONALES. Quevedo, Los Ríos.*

Agradezco mucho a la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP), y en concreto a cada una de las dignidades que conforman el Departamento de Nutrición y Calidad quienes no solo me permitieron llevar a cabo mi trabajo de investigación sino también con tacto brindarme sus conocimientos prácticos logrando despertar en mí una fascinación por las actividades de laboratorio.

Mis más sinceros agradecimientos a mis directores de tesis y mentores Ing. Jaime Fabián Vera Chang MSc., a la Ing. Wilma Maribel Llerena Silva MSc. y al Dr. Iván Samaniego Maigua Ph.D, por su paciencia y su dedicación para guiarnos a través de este trabajo.

Chumaña Zambrano Oscar Alfredo.

DEDICATORIA

Mi trabajo de investigación solo ha sido posible gracias a las personas que han sido genuinas, incondicionales y me han brindado su apoyo, fuerza y amor, les dedico mis últimos pasos en esta etapa de mi vida a mi madre Bellita mi gran ejemplo, el progreso y el temple ante las adversidades son su legado y los llevo muy presente en el corazón,

A Génesis Salomé por haber sido mi compañera durante las largas noches de desvelo y en los tropiezos que son parte del aprendizaje y la experiencia, y con gran aspiración espero seas parte de muchas etapas más, con inmenso amor para ustedes.

Chumaña Zambrano Oscar Alfredo.

RESUMEN EJECTUVO Y PALABRAS CLAVES

Actualmente el Ecuador es territorio de una considerable e importante fuente de producción de cacao y la gran variedad de subproductos resultantes, este tipo de residuos, son una materia prima de importancia económica para el país, desde hace varias décadas. La creciente demanda en alimentos funcionales con propiedades bioactivas, son de interés general para la industria alimentaria y farmacéutica, por lo que el uso de residuos de la almendra de cacao, pueden considerarse como una fuente de polifenoles, flavonoides, carotenoides y antocianinas. El enfoque investigativo de este trabajo fue determinar la presencia de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante (ABTS⁺ y FRAP) de residuos (subproductos) de cacao como la placenta empleando dos variedades tipo Nacional x Trinitario y Clon CCN-51. La evaluación del efecto de la variedad en el contenido de bioactivos se determinó mediante una prueba “t” de student y el análisis de correlación de Pearson permitió identificar los compuestos antioxidantes, responsables de la actividad antioxidante de los residuos. En placenta de la variedad tipo Nacional x Trinitario se obtuvieron valores de 235,85 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ y 227,04 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ para ABTS⁺ y FRAP respectivamente. En la variedad CCN-51 la actividad antioxidante fue de 212,72 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ y 187,47 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ para ABTS⁺ Y FRAP. El análisis de correlación de Pearson determinó que existe un efecto de la variedad de procedencia de la placenta en el contenido de carotenoides y actividad antioxidante ABTS⁺. Mientras que, el contenido de antocianinas, polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante FRAP no presentaron un efecto estadísticamente significativo de acuerdo con las variedades analizadas.

Palabras clave: Placenta, Residuos, capacidad antioxidante, radicales libres, biorrefinería.

ABSTRACT

Currently, Ecuador is the territory of a considerable and important source of cocoa production and the great variety of resulting by-products has been a very important raw material economically and culturally for the country for several decades, thanks to the demand for fine aroma cocoa that It has exceptional qualities in aroma and flavor. The growing demand for functional foods and nutritional properties are of general interest by the food and pharmaceutical industry, the first investigations about cocoa beans show a high antioxidant activity that corresponds to its components (polyphenols, flavonoids, carotenoids, anthocyanins, etc.) since they have the ability to inhibit and even stop the action of free radicals that act by oxidizing and deteriorating the human body. The investigative focus of this work is to objectively determine the presence and antioxidant capacity in the residues (by-products) of the cocoa placenta of two varieties of the Nacional x Trinitario type and Clone CCN-51 through techniques such as ABTS⁺ (2,2-azinobis-cationic radical 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and FRAP (ferric reduction tripyridyltriazine ferric Fe³⁺–TPTZ). Student's t-test and Pearson's correlation analysis were used to compare content and antioxidant activity. In placenta of the Nacional x Trinitario type variety, values of 235.85 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ and 227.04 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ were obtained by means of ABTS⁺ and FRAP respectively; on the other hand, in the CCN-51 variety 212.72 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ and 187.47 $\mu\text{M TE}\bullet\text{g}$ in the ABTS⁺ and FRAP analysis techniques respectively. Thanks to Pearson's correlation, it was determined in this study that there is an effect of variety on carotenoid content and ABTS⁺ antioxidant activity in Nacional x Trinitario type cacao and clone CCN-51. On the other hand, the content of anthocyanins, polyphenols, flavonoids and FRAP antioxidant activity did not present a statistically significant effect according to the varieties analyzed.

Keywords: Placenta, waste recovery, antioxidant capacity, free radicals, biorefinery.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN EJECTUVO Y PALABRAS CLAVES	viii
ABSTRACT	ix
TABLA DE CONTENIDO	x
INDICE DE TABLAS	xvi
INDICE DE FIGURAS	xvii
INDICE DE ANEXOS	xviii
CÓDIGO DUBLÍN	xix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1. Problema de la investigación.	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.	6
1.1.3. Sistematización del problema.	7

1.2.	Objetivos.....	7
1.2.1.	Objetivo general.....	7
1.2.2.	Objetivos específicos.	7
1.3.	Hipótesis.	7
1.4.	Justificación.	8
CAPÍTULO II		9
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN		9
2.1.	Marco Conceptual.....	10
Cacao.....		10
Valorización de residuos		10
Antioxidantes		10
Biocompuestos fenólicos.....		10
Biorrefinería		10
2.2.	Marco Referencial	11
2.2.1.	Cacao.	11
2.2.2.	Cacao en el Ecuador.	11
2.2.2.1.	Variedades de cacao.	12
Cacao Nacional		12
Tipo Nacional x Trinitario.....		13
Cacao Criollo		14
Cacao Forastero.....		15
Cacao Trinitario.....		15

Clon CCN-51	16
Adaptación de cacao.....	16
Postcosecha del cacao.	17
Residuos de la cadena de beneficio del cacao.....	17
Placenta de cacao.	18
2.2.2. Economía circular.....	19
2.2.3. Valorización de residuos.....	19
2.2.4. Biorrefinería.....	20
2.2.5. Compuestos bioactivos.	20
2.2.6. Actividad antioxidante.....	20
Polifenoles.....	21
Flavonoides.	21
Antocianinas.....	22
Carotenoides.....	22
2.2.7. Antioxidantes.....	23
2.2.8. Función de los antioxidantes.....	23
2.2.9. Radicales libre.	24
2.2.10. Métodos analíticos.....	24
Método ABTS ⁺	24
Método FRAP.	24
Ventajas y desventajas de métodos de análisis de capacidad antioxidante (ABTS ⁺ y FRAP).	26

CAPITULO III	27
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	27
3.1. Localización.	28
3.2. Tipos de investigación.....	28
3.2.1. Investigación Exploratoria.....	28
3.2.2. Investigación experimental.	28
3.3. Método de investigación.	29
3.3.1. Método inductivo – deductivo.....	29
3.3.2. Métodos estadísticos.	29
3.4. Fuentes de recopilación de información.....	29
3.4.1. Fuentes primarias.....	29
3.4.2. Fuentes secundarias.....	29
3.5. Diseño de la investigación.....	30
3.5.1. Esquema del análisis de varianza.	30
3.5.2. Análisis de correlación de Pearson.....	31
3.6. Instrumentos de la investigación.	32
Variables de estudio	32
3.6.1. Material vegetal.	33
3.6.2. Recolección de muestras.	33
3.6.3. Preparación de las muestras.	33
3.6.5. Antioxidantes totales.	33
Contenido total de antocianinas (TAC).....	33

Contenido total de carotenoides (TCC).....	34
3.6.4. Propiedades funcionales	34
Extracción de compuestos bioactivos.	34
Contenido total de polifenoles (TPC).....	35
Flavonoides totales.	35
3.6.6. Actividad antioxidante.	35
Actividad antioxidante ABTS ⁺	35
Actividad antioxidante FRAP	35
3.7.2. Diagrama de proceso experimental	36
3.7. Tratamiento de datos.	37
3.8. Recursos Humanos y Materiales.	37
3.8.1. Recursos Humanos.	37
3.8.2. Materiales.	37
CAPÍTULO IV	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1. Resultados.	41
4.1.1. Antioxidantes totales	41
Antocianinas.....	41
Carotenoides....	43
Polifenoles Totales	45
Flavonoides Totales.....	47
4.1.2. Actividad antioxidante	50

Actividad antioxidante por ABTS ⁺	50
Actividad antioxidante por FRAP.....	52
CAPÍTULO V	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1. Conclusiones	57
5.2. Recomendaciones.....	58
CAPÍTULO VI.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	59
CAPÍTULO VII	69
ANEXOS.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones técnicas para la adaptación del cacao	17
Tabla 2. Ventajas y desventajas de métodos de análisis de capacidad antioxidante (ABTS y FRAP)	26
Tabla 3. Localización del trabajo experimental	28
Tabla 4. Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao	30
Tabla 5. Prueba “t” de Student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y tipo NacionalxTrinitario) en el contenido de actividad antioxidante en placenta de cacao.....	31
Tabla 6 – Matriz de correlación para relacionar el contenido de antioxidantes totales (polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas) y actividad antioxidante en residuos de cacao.....	32
Tabla 7 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para antocianinas totales.....	42
Tabla 8 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para carotenoides totales.	44
Tabla 9 - Validación de la curva de calibración de ácido gálico para el método de determinación de polifenoles totales.....	45
Tabla 10 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para polifenoles totales.....	47
Tabla 11 - Tabla 7 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para flavonoides totales.	49
Tabla 12 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para actividad antioxidante ABTS ⁺	51
Tabla 13 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para actividad antioxidante FRAP.....	53
Tabla 14 - Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos presentes en la placenta de cacao.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Ishikawa elaborado para el análisis de causa-efecto del problema considerado en este estudio.....	5
Figura 2. Cacao Nacional 100 % Pura	12
Figura 3. Pirámide genética del cacao Nacional	13
Figura 4. Tipo NacionalxTrinitario	14
Figura 5. Cacao Criollo.....	14
Figura 6. Cacao Forastero.....	15
Figura 7. Cacao Trinitario.....	15
Figura 8. Clon CCN-51.....	16
Figura 9. Partes del Theobroma Cacao L.....	18
Figura 10. Economía circular.....	19
Figura 11. Relación estabilizante/neutralizante de un antioxidante ante un Radical libre.....	23
Figura 12. Diagrama de proceso experimental.....	36
Figura 13. Contenido de antocianinas totales en placenta de cacao tipo NacionalxTrinitario y clon CCN-51.....	41
Figura 14. Contenido de carotenoides totales en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN-51.....	43
Figura 15 - Curva de calibración promedio para la determinación de contenido de Polifenoles Totales en placenta de cacao de dos variedades.....	45
Figura 16 - Contenido de polifenoles totales en placenta de cacao tipo NacionalxTrinitario y clon CCN-51 expresado en $\text{mg AGE} \bullet 100\text{g}^{-1}$	46
Figura 17. Curva de calibración promedio para la determinación del contenido de Flavonoides Totales en placenta de cacao de dos variedades.....	48
Figura 18. Contenido de flavonoides totales en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario y cacao CCN-51 expresado en $\text{mg AGE} \bullet 100\text{g}^{-1}$	48

Figura 19. Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método ABTS ⁺	50
Figura 20. Actividad antioxidante ABTS ⁺ en cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN-51.	51
Figura 21. Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método FRAP.	52
Figura 22. Actividad antioxidante FRAP en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN-51.....	53

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Evidencia fotográfica del proceso postcosecha.....	70
Anexo 2. Evidencia fotográfica de la fase de extracción de compuestos bioactivos.....	71
Anexo 3. Medición de absorbancias.....	71

CÓDIGO DUBLÍN

Título	“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PLACENTA DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.), VARIEDADES CLON CCN-51 Y TIPO NACIONAL x TRINITARIO”.
Autor	Chumaña Zambrano Oscar Alfredo
Palabras claves	Placenta, Residuos, capacidad antioxidante, radicales libres, biorrefinería.
Editorial	Quevedo. UTEQ, 2022
Resumen	Actualmente el Ecuador es territorio de una considerable e importante fuente de producción hablando en materia de cacao y la gran variedad de subproductos resultantes, es una materia prima muy importante económica y culturalmente desde hace varias décadas para el país, gracias a la demanda de cacao fino de aroma que posee cualidades excepcionales en aroma y sabor. La creciente demanda en alimentos funcionales y propiedades nutricionales son de interés general por la industria alimentaria y farmacéutica, las primeras investigaciones acerca de la almendra de cacao demuestran una alta actividad antioxidante que corresponde a sus componentes (polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas, etc) ya que poseen la capacidad de inhibir y hasta detener la acción de los radicales libres que actúan oxidando y deteriorando el organismo del ser humano. El enfoque investigativo de este trabajo es determinar la presencia y la capacidad antioxidante en los residuos (subproductos) objetivamente la placenta de cacao de dos variedades tipo Nacional x Trinitario y Clon CCN-51 mediante técnicas como ABTS⁺ Y FRAP. Se emplearon la prueba “t” de student y un análisis de correlación de Pearson para realizar la comparación entre el contenido y la actividad antioxidante. En placenta de la variedad tipo Nacional x Trinitario se obtuvieron valores de 235,85 µM TE•g y 227,04 µM TE•g mediante ABTS⁺ Y FRAP respectivamente; por otro lado, en la variedad CCN-51 212,72 µM TE•g y 187,47 µM TE•g en las técnicas de análisis ABTS⁺ Y FRAP respectivamente. Gracias a la correlación de Pearson se determinó en este estudio que existe un efecto de la variedad en el contenido de carotenoides y actividad antioxidante ABTS⁺ en cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN-51. Por otra parte, el contenido de antocianinas, polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante FRAP no presentaron un efecto estadísticamente significativo de acuerdo con las variedades analizadas.
Abstract	Currently, Ecuador is the territory of a considerable and important source of cocoa production and the great variety of resulting by-products has been a very important raw material economically and culturally for the country for several decades, thanks to the demand for fine aroma cocoa that It has exceptional qualities in aroma and flavor. The growing demand for functional foods and nutritional properties are of general interest by the food and pharmaceutical industry, the first investigations about cocoa beans show a high antioxidant activity that corresponds to its components (polyphenols, flavonoids, carotenoids, anthocyanins, etc.) since they have the ability to inhibit and even stop the action of free radicals that act by oxidizing and deteriorating the human body. The investigative focus of this work is to objectively determine the presence and antioxidant capacity in the residues (by-products) of the cocoa placenta of two varieties of the Nacional x Trinitario type and Clone CCN-51 through techniques such as ABTS⁺ (2,2-azinobis-cationic radical 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and FRAP (ferric reduction tripyridyltriazine ferric Fe³⁺ –TPTZ). Student's t-test and Pearson's correlation analysis were used to compare content and antioxidant activity. In placenta of the Nacional x Trinitario type variety, values of 235.85 µM TE•g and 227.04 µM TE•g were obtained by means of ABTS⁺ and FRAP respectively; on the other hand, in the CCN-51 variety 212.72 µM TE•g and 187.47 µM TE•g in the ABTS⁺ and FRAP analysis techniques respectively. Thanks to Pearson's correlation, it was determined in this study that there is an effect of variety on carotenoid content and ABTS⁺ antioxidant activity in Nacional x Trinitario type cacao and clone CCN-51. On the other hand, the content of anthocyanins, polyphenols, flavonoids and FRAP antioxidant activity did not present a statistically significant effect according to the varieties analyzed.
Descripción	90 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URL	

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es originario de las regiones tropicales de América; su aparición se remonta al siglo XX antes de Cristo (a. c.), lo que demuestra una antigüedad de 2000 años atrás. Por sus características organolépticas superiores, el cacao nacional es la variedad más demandada por las industrias chocolateras a nivel internacional. Antes del auge petrolero, el cacao fue el producto que movía la economía ecuatoriana; actualmente, Ecuador está en cuarto lugar de los productores de almendras de cacao [1], [2].

El cacao se exporta para la producción de variedades de productos como: chocolate o la manteca de cacao usada en confitería. El cacao arriba o fino de aroma es el más atractivo por su aroma y sabor, que lo hace más apetecible por estos productores extranjeros que optan por agregar a sus fórmulas el cacao ecuatoriano [3].

Las propiedades funcionales con respecto a la composición del cacao lo refieren como una fuente alimentaria rica en antioxidantes naturales, en concreto polifenoles, los granos de cacao están compuestos de cantidades significantes de flavonoles, que se pierden de manera importante en los procesos de beneficio (fermentación, secado), por las condiciones climáticas, debido al genotipo y también a la industrialización (Tostado, Molienda, Conchado) lo que disminuye su poder antioxidante [4].

La actividad antioxidante que aumenta considerablemente la notoriedad y el valor de un alimento, presente en la composición del cacao (*Theobroma cacao* L.) se involucra de manera directa con el valor nutricional y las características organolépticas (color, sabor, palatabilidad); su funcionalidad es desactivar la actividad de los radicales libres, reduciendo el daño y protegiendo al organismo de enfermedades de tipo degenerativo como, cáncer, diabetes, trastornos cardiovasculares, etc [5].

Los polifenoles derivan en dos tipos: (no flavonoides y en ácidos fenoles); estos flavonoides purificados optan por un color amarillo y los compuestos flavonoides (flavonas, antocianos y taninos) son responsables del color rojo, naranja, azul, violeta y morado en las frutas, flores; la mayoría de estos compuestos son indispensables en la alimentación humana por su gran efecto antioxidante que es benéfico para la salud. Compuestos tales como los carotenoides (amarillo, naranja) y las antocianinas (rojo, azul) son identificables mediante el color del vegetal o fruta estudiado [6],[9].

A pesar de su gran acogida comercial y el efecto antioxidante que aporta el consumo de cacao, el proceso post-cosecha conduce a una gran afectación para el medio ambiente. De la explotación cacaotera se aprovecha únicamente el grano (20 %), generando residuos como cáscara, placenta y mucílago que alcanzan hasta el 80 % del peso neto de la fruta. Estos subproductos son una fuente de enfermedades y microorganismos cuya acumulación deriva en la disminución consecuente del pH del suelo y la destrucción minerales (K, P, Ca) que nutren a las plantas; por otro lado, aumenta la proliferación de hongos y plagas que atacan al cultivo [10], [11].

A pesar de la abundancia de estos residuos, existe aún muy poco aprovechamiento, principalmente debido al desconocimiento de sus propiedades; por lo cual la presente investigación se enfocó en determinar el contenido de antioxidantes totales y la actividad antioxidante en la placenta del cacao.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

El principal problema que existe alrededor de la industria cacaotera es la escasez de alternativas para el aprovechamiento de residuos (placenta) para la obtención de compuestos de alto valor biológico. Los insuficientes estudios acerca de la composición de residuos del cacao (placenta) representan un alto desaprovechamiento por parte de las industrias afines (alimentaria) para su aplicación en alimentos y productos funcionales en beneficio de la salud humana. La escasa valorización de residuos de cacao representa una oportunidad para que las empresas agroalimentarias hagan uso de estos subproductos. El desconocimiento de una adecuada gestión de residuos impide que las empresas apliquen un plan de control de desechos dentro de las fincas de producción derivando en descargas y acumulaciones de residuos en el campo, generando un impacto negativo para el medio ambiente. En especial el suelo y el agua sufren la generación de ácidos orgánicos y el desgaste de minerales, lo cual disminuye la calidad del suelo, además de constituir focos de plagas y enfermedades que perjudican a los mismos trabajadores, produciendo mal olor, proliferación de moscas y roedores. En base al análisis causa-efecto realizado según la metodología Ishikawa (Figura 1), se ha determinado que las causas que principalmente originan este problema se encuentran relacionadas en los aspectos investigativos, metodológicos, materiales, medio ambiente y sector cacaotero.

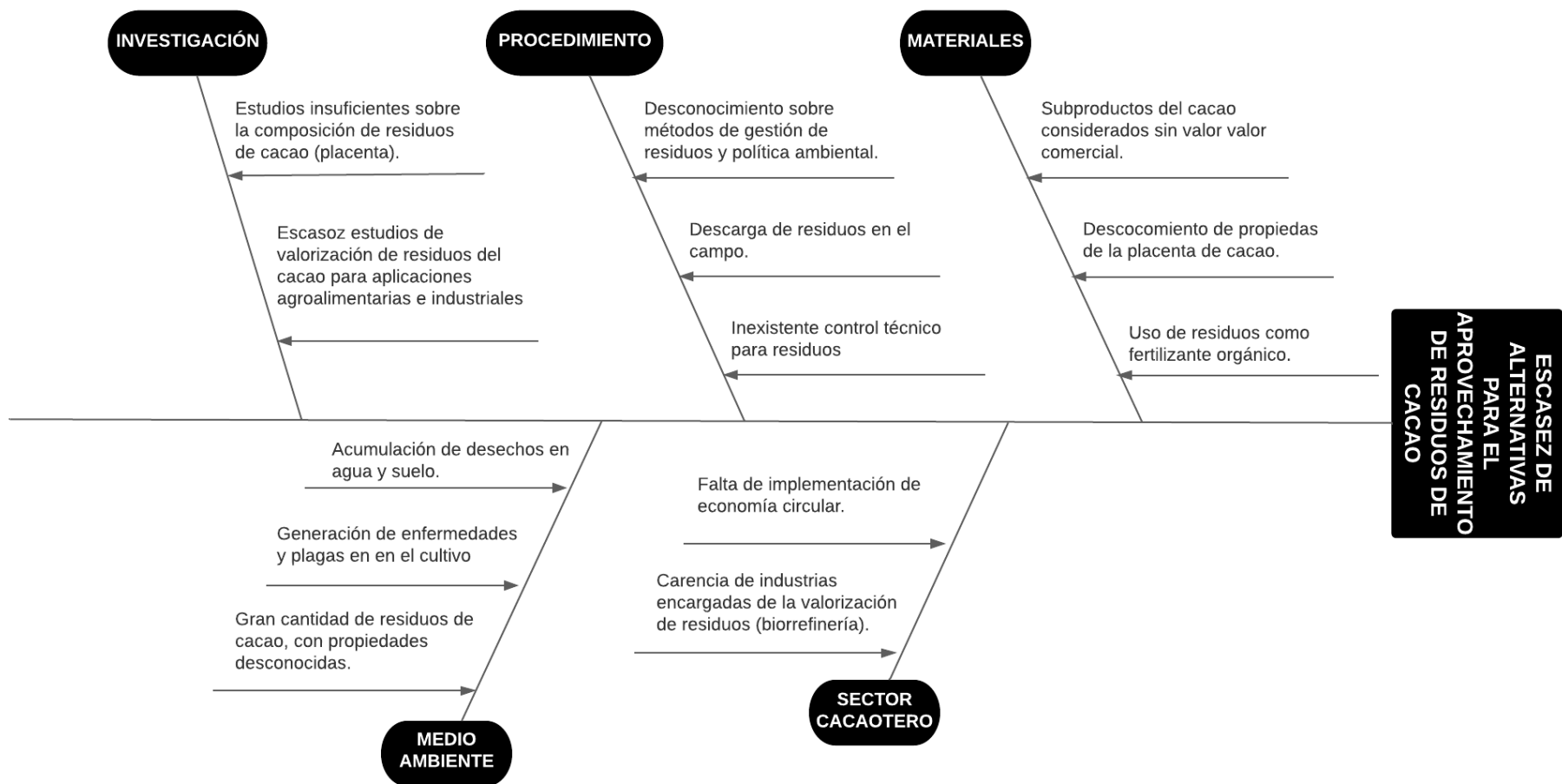


Figura 1. Diagrama de Ishikawa elaborado para el análisis de causa-efecto del problema considerado en este estudio.

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

Diagnóstico.

Representando uno de los productos de más acogida a nivel internacional entre las industrias chocolateras del mundo, dentro de la producción del cacao se aprovecha industrialmente la semilla o almendra, sin embargo, el resto de fruto es desechado in situ por las mismas productoras sin ningún tipo de procesamiento o aprovechamiento para otorgarles una utilidad más industrial y un valor económico que permita que el producto sea ocupado en su totalidad.

A estos subproductos (mazorca, placenta, cascarilla y mucílago) no se les ha brindado los suficientes estudios y acreditación que den paso a un desarrollo técnico que impida que los mismos se conviertan por desuso en focos de contaminación para el aire, el suelo y el agua dentro de las fincas productoras. Y por otro lado en comparación con los granos que son aprovechados por las industrias por sus características sensoriales y capacidades nutricionales (antioxidantes), es de interés científico otorgarles un valor semejante o aproximado al menos en materia de compuestos bioactivos debido la posible bioacumulación de antioxidantes ya que al igual que las semillas forman parte de la misma mazorca que en gran parte de desechada.

Todas las causales que atañen esta problemática de escasas alternativas para el aprovechamiento de residuos del cacao están especificadas en el (Figura 1).

Pronóstico.

Inalterablemente por mucho tiempo la producción de cacao ha sido foco de contaminación provocado por su misma cadena beneficio al tener una gran cantidad de desechos resultantes del proceso postcosecha, produciendo un desgaste considerable al ecosistema que lo rodea (aire, suelo y agua) afectando colateralmente a la fauna y flora, así como a su misma producción.

1.1.2. Formulación del problema.

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

1.1.3. Sistematización del problema.

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

¿Cuál será el contenido polifenoles totales en la variedad tipo Nacional x Trinitario?

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

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

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

1.2.2. Objetivos específicos.

- Determinar el contenido de antioxidantes totales (antocianinas, carotenoides, polifenoles y flavonoides) de placenta de cacao (variedades Clon CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario).
- Evaluar la actividad antioxidante de placenta de cacao (variedades Clon CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario).
- Evaluar el efecto de la variedad en el contenido de bioactivos y actividad antioxidante de placenta de cacao: variedades Clon CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario.

1.3. Hipótesis.

- **H₀:** $\mu_1 = \mu_2$ H₀: No existe un efecto de la variedad de cacao (clon CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario) en la actividad antioxidante.
- **H₁:** $\mu_1 \neq \mu_2$ H₁: Existe un efecto de la variedad de cacao (clon CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario) en la actividad antioxidante.

1.4. Justificación.

La industria del cacao se especializa actualmente en el procesamiento de los granos, para obtención de productos como: polvo, licor, manteca de cacao entre otros, ampliamente utilizados en confitería y pastelería. El aprovechamiento de residuos (subproductos) dentro del sector agroalimentario es de gran relevancia, para el desarrollo de nuevos alimentos y productos funcionales; no obstante, en el beneficio del cacao se aprovecha un 20 % del peso total del fruto, eliminando la mayor cantidad de subproductos del fruto (cáscara, mucílago, placenta y cascarilla) y desaprovechando enormemente el potencial de estos residuos que forman parte del fruto, en un principio. Actualmente los estudios acerca del mucílago son cada vez más recurrentes, pero el resto de las partes residuales como la mazorca, placenta y la cascarilla no han sido estudiados de manera que se evidencie si poseen propiedades benéficas que puedan ser aprovechadas en la industria alimentaria. La placenta está compuesta principalmente de agua (17,02%); proteína (2,45%); extracto etéreo (1,86%); ceniza (1,13%); fibra (5,33%) y aporta un contenido calórico de 491,68 kcal, esta composición proximal y la coloración de las variedades de cacao, nos permite estimar la presencia de compuestos que puedan estar respondiendo a la actividad antioxidante específicamente y su proporción, dado que nuestra industria nacional no destina recursos para la biorrefinería de residuos en el beneficio del cacao, es importante tomar en cuenta el potencial que estos pueden brindar, y colateralmente solucionar un problema de interés medio ambiental o al menos reducirlo considerablemente [12]–[14].

Sobre el contenido de antioxidantes de la placenta, se dispone aún de poca información, por lo que, el objetivo del presente trabajo es caracterizar la placenta de cacao de las variedades clon CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario, para la obtención de compuestos de alto valor biológico e industrial. Con esta información se pretende incorporar componentes bioactivos de tipo antioxidantes (polifenoles, flavonoides, carotenoides y antocianinas) para mejorar propiedades funcionales de alimentos de alto valor calórico y consumidos habitualmente en la dieta.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual.

Cacao

Es un árbol mediano de altura (5m – 8m), que varía su forma según las condiciones ambientales. Del cual proceden frutos con forma de baya, que se encuentra dividida por celdas conteniendo aproximadamente 20 semillas cubiertas de una pulpa blanca y acuosa, se las conoce como almendras empleadas industrialmente para la producción de chocolate [15].

Valorización de residuos

La valorización de residuos agroindustriales se ha presentado hasta el momento como la facultad de aprovechar dichos residuos en otra cadena de producción, ya sea por su contenido nutricional, propiedades tecnológicas, o porque representen una fuente importante de compuestos químicos [16].

Antioxidantes

Se considera a aquellos compuestos químicos que poseen los atributos para interactuar con los radicales libres y neutralizar su actividad que ocasiona daño en el organismo, llamados también “carroñeros de radicales libres” [17], [18].

Biocompuestos fenólicos

Es el grupo de todas aquellas sustancias que tienen propiedades fenol, de origen vegetal. Algunos todavía no han sido identificados, sin embargo, la mayoría tienen un importante papel en la prevención de enfermedades gracias a su capacidad antioxidante y su gran biodisponibilidad [19].

Biorrefinería

Este término se lo asocia comúnmente a la industria alimenticia y la obtención de materia prima para el procesamiento de alimentos, donde se producen una gran variedad de productos y subproductos a partir de ella, la biorrefinería es la explotación de los recursos desaprovechados optimizando el proceso, y economizando los recursos para generar más ganancias [20].

2.2. Marco Referencial

2.2.1. Cacao.

El cacao es uno de los árboles originarios de los países de América del sur y África, su principal virtud es el sabor y olor almendrado del fruto, gracias a los factores climatológicos que son primordiales para su desarrollo en estas regiones. Hoy en día podemos obtener varios derivados de esta fruta como lo es el licor de cacao, manteca de cacao, chocolates. El mercado con mayor producción a nivel mundial es la industria del chocolate y su popularidad es tal que se usa en otras industrias como pastelería, confitería, cervecera, entre otras [21].

Es un árbol cultivado en zonas tropicales del continente americano, siendo los mayas quienes lo cultivaron y produjeron denominando al fruto *cacau* (*cac-rojo* y *cau-fuego*) simbolizando su color la fuerza y la energía que este aportaba al consumirlo, en cambio todas estas culturas prehispánicas (mayas, toltecas y aztecas) llamaron *xocolatl* (*Chocolate*) al líquido bebible que hacían a partir de las semillas nombre que hacía alusión al dios Quetzacoatl por lo que creían que este fruto era un regalo divino. Más tarde Cristóbal Colón fue el primer europeo en probar la bebida e introducirla a su cultura, pero no fue hasta que Hernán Cortés la conoció se le otorgó un valor como moneda de intercambio, llegando incluso a ser intercambiado por oro, dándole aún más prestigio a la receta del chocolate y convirtiéndola en una bebida solo para la aristocracia [22].

2.2.2. Cacao en el Ecuador.

La industria del cacao en Ecuador es la actividad comercial que tiene mayor dinamismo, genera mucha riqueza no solo económica sino también cultural, posicionándolo dentro del comercio internacional entre los mejores productores, ya que las unidades que se dedican a la producción individual o asociativa han permitido el amplio desarrollo de casas cacaoteras, fabricas caseras de producción de chocolate y de industrias extranjeras que usan nuestro producto como materia prima para sus productos llegando hasta galardonar nuestro cacao como el mejor del mundo por diversos países. Dentro de todo este contexto cacaotero, su producción ha favorecido el ingreso de miles de familias campesinas y desarrollar la economía ecuatoriana principalmente de provincias como: Manabí, Guayas, El oro y Los Ríos [23].

Ecuador es uno de los países con mayor producción mundial de cacao fino en aroma en concreto se atribuye el 70 % de esta producción, gracias a su tierra fértil y rica en minerales además de que el cacao es históricamente compatible con estos suelos y climas ecuatorianos hacen que el grano obtenga ese aroma característico. Las provincias que más destacan en la producción de cacao el año 2016 son el Guayas con 28%, Los Ríos 23 % y Manabí 13% de las 19 provincias que producen este fruto [24].

2.2.2.1. Variedades de cacao.

Cacao Nacional

Es el mundialmente reconocido producto del Ecuador también llamado como Cacao Arriba o pepa de oro (Figura 2), el motivo de su fama recae en sus características organolépticas tan únicas diferenciadas de todas las otras variedades convirtiéndolo en el preferido del mercado internación para la industria chocolatera, su fino aroma y su sabor son resultado de un conjunto de condiciones geográficas, de temperatura, y ambiente que solo son encontradas en nuestro país [25].

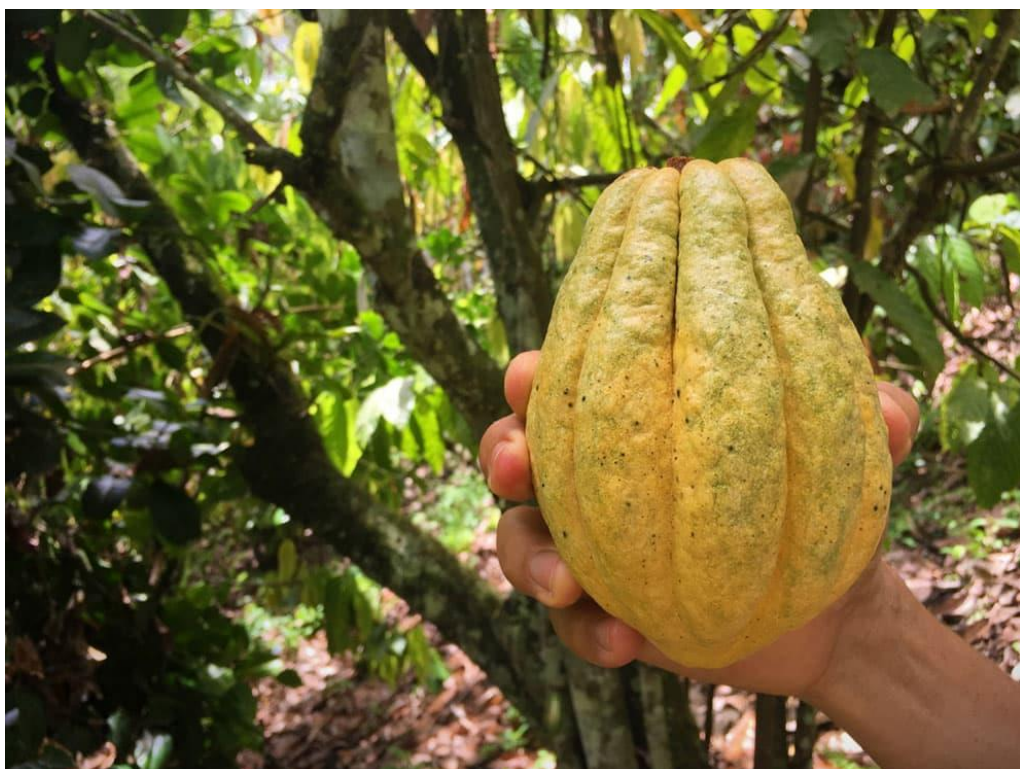


Figura 2. *Cacao Nacional 100 % Pura*

Fuente: [26].

La variedad Nacional se encuentre en focos muy puntuales y resguardados por entidades que la salvaguardan y extraen sus cualidades al máximo, solo representa el 1% de la producción ecuatoriana de cacao (con 100% de pureza) y sus árboles datan de hace más de 100 años según estudios de ADN realizados (Figura 3), concretamente en la reserva natural ubicada en Manabí conocida como Piedra de Plata. Por debajo de la variedad “antigua o pura” existe el cacao Nacional “Vestigio” que debido a la interacción con variedades invasoras y el ataque de las plagas (Monilla y Escoba de bruja), esta apenas tiene un aproximado de pureza entre el 70 al 99 %, debido a cruzamientos con el cacao Trinitario, del cual se produce un 5% solamente. El tipo Nacional x Trinitario, presenta una pureza genética del 30 al 69%, con una producción del 25 % en el Ecuador. Sin embargo, las condiciones climáticas actuales están propiciando una pronta extinción de esta variedad que ya no se sustenta por si sola, ni con la ayuda de la mano del hombre; sumado a la deforestación indiscriminada lo que hace que la hibridación de variedades más aptas y productivas bajo estas condiciones sean la opción más factible de los productores por lo que llegará el día en que el cacao Nacional ya no sea viable comercialmente y no se encuentre más en el mercado del mundo [27].

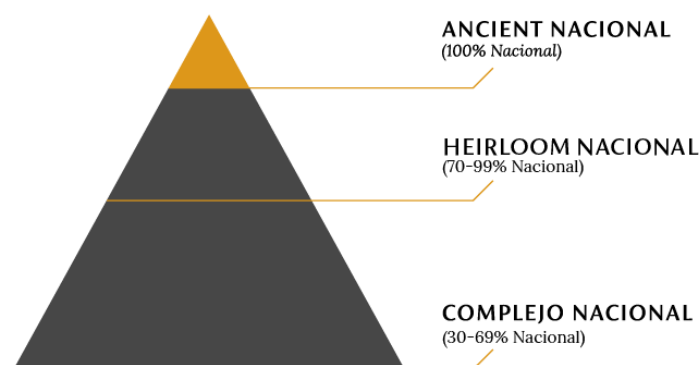


Figura 3. Pirámide genética del cacao Nacional

Fuente: [26].

Tipo Nacional x Trinitario

En la actualidad no existe una variedad Nacional como tal, debido a que las variedades con genes netamente puros existieron únicamente hasta 1890 de forma natural. Los cacaos Trinitarios de origen venezolano fueron invadiendo y ocasionando una hibridación natural que consiste en una población que es conocida como tipo Nacional x Trinitario.

Esta se caracteriza por unas tonalidades de amarillo claro hasta amarillo oscuro similares, con una textura muy rugosa en el exterior (Figura 4) [28].



Figura 4. *Tipo Nacional x Trinitario*

Fuente: [26].

Cacao Criollo

El cacao Criollo es un tipo de material de bajo rendimiento, con una deficiente cantidad de mazorcas, produce pocas semillas y posee una gruesa cáscara muy susceptible a las plagas (Figura 5). Sin embargo, sus semillas desprenden una gama de sabor afrutado y especiado muy acentuados, características por las cuales se le denomina el grano del sabor y se usa para productos lujosos de chocolatería por lo que es considerado de muy alta calidad [29].



Figura 5. *Cacao Criollo.*

Fuente: [30].

Cacao Forastero

Las semillas de cacao Forastero (Figura 6), tienen una forma curvada y aplanada, es muy conocido a nivel mundial, los mayores productores africanos son República de Ghana y Costa de Marfil. Organolépticamente hablando, este cacao es de una calidad inferior en cuanto a sabores frutales y aromas especiados; sin embargo, tiene un marcado sabor a chocolate. Por lo que, los fabricantes de chocolate añaden un porcentaje de este en sus recetas, como base que destaca el sabor achocolatado, y añaden bajas cantidades de cacao criollo y otro superior a sus fórmulas para agregar complejidad y calidad [29].



Figura 6. *Cacao Forastero.*
Fuente: [30].

Cacao Trinitario

El cacao Trinitario (Figura 7) es una mezcla híbrida entre cacao Criollo y Forastero, se caracteriza por un tono violeta que se torna a color naranja en su madurez. Debido a los cruzamientos, es genéticamente más estable y muy variado de forma, por lo que a veces se dificulta diferenciarlo entre otras variedades. Entre sus cualidades más destacables están su gran resistencia a plagas y enfermedades [31], [32].



Figura 7. *Cacao Trinitario*

Clon CCN-51

El cacao CCN-51 (Figura 8), fue estudiado y desarrollado por Homero Castro en el año de 1965, para ser liberado al público en el año de 1984. Este cruce contiene apenas el 1,1% de genes del cacao Nacional, 45,4% de cacao Iquitos Marañón Collection IMC, 22,2% de Criollo, 21,5% de Amelonado, 3,9% de Contamana, 2,5% de Purús y en 2,1% de Marañón. Con el objetivo de encontrar un clon con alto rendimiento, calidad y con resistencia a las enfermedades se desarrolló un material con resultado muy satisfactorio. Esta hibridación artificial es llamada por el mercado “cacao a granel” y representa el 70% de la producción total del cacao dentro de Ecuador [33].



Figura 8. *Clon CCN-51.*
Fuente: [34].

Adaptación de cacao.

Para un buen desarrollo y aprovechar al máximo la calidad que el fruto puede ofrecer, la producción de cacao requiere de un buen clima y suelo lleno de nutrientes como parte esencial para la adaptación del árbol y otros factores como la altura del suelo, rango de plantación y textura del suelo, las condiciones específicas se detallan en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones técnicas para la adaptación del cacao

Parámetro de adaptabilidad y rango de adaptación	
Piso Altitudinal (Óptima)	900 msnm
Rango (Máximo y Mínimo).	0-1.200 m.s.n.m.
Temperatura (Óptima)	24° C
Rango (Mínimo y Máximo)	20-30° C
Humedad relativa	77-85% (optimo 80%)
pH Suelo	5.5 -6.5° (optimo 6,2°)
Textura Suelo	F, Fa, FL, FAL
Fotoperiodo	11.5 h/día (Sombra)
Precipitación óptima	2500 mm (bien distribuidos)
Precipitación Mínima y Máxima 1	1.500 -2.500 mm
Topografía	15° o 25%de pendiente máximo

Fuente: [35].

Postcosecha del cacao.

La fermentación es un proceso fundamental para que su aroma y sabor tengan buenas características, normalmente los pequeños productores realizan la fermentación por métodos empíricos, lo que no es muy beneficio, debido a la contaminación que puede haber. Según varios estudios, se recomiendan realizar la fermentación en cajones de maderas donde no estén propensos a lluvias y sol directo y que no contengan olores desagradables. El tiempo de fermentación es de 3 a 5 días y luego se secan al sol en tendales adecuados, hasta lograr obtener almendras de aproximadamente de 7% de humedad [36].

Residuos de la cadena de beneficio del cacao.

Se consideran como residuos alimentarios a cualquier parte de las materias primas o de los productos alimenticios que se descartan durante el proceso de transformación, por parte de productores, distribuidores, negociantes y/o clientes debido a que no son necesarios para el procesamiento. En la industrialización de frutas y vegetales, se desechan entre un 25 a 30% de subproductos entre semillas, cáscaras, cortezas y bagazo, que son fuente de compuestos con potencial bioactividad. El manejo de estas cáscaras como residuos en las plantaciones es complejo debido a su peso y volumen, generan problemas como la producción de malos olores, contaminación de suelos y cuerpos de agua. En el caso específico del cacao, se produce la propagación del hongo fitopatógeno *Phytophthora spp.*, considerado el principal causante del deterioro productivo y económico del cacao.

Sin embargo, esta clase de residuos orgánicos son potencialmente aprovechables por su composición rica en bioactivos y nutrientes; que pueden ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica. En los subproductos del cacao, se ha encontrado compuestos bioactivos con potencial antioxidante y fibra dietética (fenoles, vitaminas y enzimas, entre otros) [37].

Dentro del aprovechamiento del cacao la semilla representa un aproximado del 20 % del cual un 12 % pertenece a la cascarilla, la cáscara de la mazorca es la parte más abundante de todos los subproductos que surgen a partir del manejo postcosecha del cacao esta llega a ser alrededor del 80 % la placenta que comúnmente se asocia a la cáscara gruesa de la mazorca como un solo residuo desechado es poco más o menos el 2 % de su composición [14], [38]



Figura 9. *Partes del Theobroma Cacao L.*

Fuente: [39].

Placenta de cacao.

La placenta de cacao es la vena que cumple las funciones de nutrir las semillas y sostener el eje central dentro del fruto donde están incorporados los granos, formando en su totalidad una pulpa que contiene azúcares y otros componentes iguales que conforman el 2 % de la mazorca, en estudios físico-químicos la placenta contiene un importante contenido de carbohidratos, fibra ceniza y proteínas lo que la hace atractiva desde el punto de vista nutricional como materia primera para la elaboración de productos, sin embargo su utilización aún es escasa. [40]–[42].

La placenta de cacao es la parte central de la mazorca que funciona como eje debido a las ramificaciones que posee, mismas que permiten el buen desarrollo de las almendras proveyendo los nutrientes que la planta previamente absorbió, según su variedad cambia su grosor y tamaño. La placenta del cacao Nacional mide aproximadamente entre 11 – 13 cm, organolépticamente tiene un sabor dulce y un olor atrayente con un color blanco amarillento que va aumentando dependiendo del grado de oxidación una vez separada de la mazorca gracias a la reacción química al momento de entrar en contacto con el oxígeno, generalmente es consumida fresca por los agricultores que trabajan el beneficio del cacao dado que les aporta energía [42].

2.2.2. Economía circular.

La economía circular (Figura 10), es una elección al modelo clásico de economía lineal establecido con la idea de usar y desechar. En este tipo de modelo se busca reducir, reutilizar y reciclar para mantener la utilidad y el valor de los productos, componentes y materiales, convirtiendo un residuo en un recurso para utilizarlo como materia prima en otros procesos, de este modo cierra el ciclo y amplía su vida útil el mayor tiempo [43].



Figura 10. Economía circular.
Fuente: [44].

2.2.3. Valorización de residuos.

La valorización de residuos consiste en otorgarle valor agregado a un residuo para darle una utilidad mediante el procesamiento y reemplazarlo por otras materias que cumplirían una función en específica. La valorización de residuos se traduce en tres etapas: reducción de costes en materia prima para las empresas, creación de nuevas plazas de trabajos para tratar

estos residuos y mejoría en el aspecto medio ambiental. El manejo de residuos sólidos orgánicos en la agricultura del Ecuador y en varias partes del mundo, se ha establecido como un inconveniente importante. Una inapropiada inspección, deriva por la falta de conciencia y educación ambiental frecuente sobre este aspecto. El reciclaje de estos desechos tanto de origen vegetal, animal y doméstico, debe ser constituido por un medio apto para el manejo integral de estos residuos sólidos y orgánicos. En las zonas de monocultivo agrícola como las áreas cacaoteras, el reciclaje de los residuos que quedan posteriormente a la cosecha podría ser de gran ayuda para preservar recursos naturales, cuerpos hídricos y espacios ambientalmente sensibles [45].

2.2.4. Biorrefinería.

La biorrefinería es un proceso que se integra transformando de forma sostenible una materia prima de origen biológico (animal o vegetal) de productos que se comercializan tales como alimentos, piensos, materiales, productos químicos y/o energía. Las biorrefinerías tienen como finalidad la transformación de la biomasa que resulta en una gamma distinta de productos con valor agregado (combustibles, energía, sustancias químicas y productos finales) [46].

2.2.5. Compuestos bioactivos.

Son compuestos químicamente beneficiosos para las personas debido a su acción en la función corporal, ocasionando mejoras en la salud y bienestar o en la prevención de enfermedades por su efecto antioxidante, antiinflamatorio y que ayuda a prevenir la actividad degenerativa de algunas enfermedades en el organismo. En este grupo de compuestos se encuentran los polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas y vitaminas C y E [47].

2.2.6. Actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante es la propiedad de algunas sustancias para impedir o retrasar la oxidación de compuestos de los radicales libres el organismo humano. Estas moléculas impiden que los radicales libres del oxígeno (RL) y las especies reactivas del oxígeno (EROS) se acoplen al oxígeno y en su reacción interactúen rápido con el resto de las moléculas presentes, evitando el daño de células vitales. Interfieren con los ciclos oxidativos para inhibir o retardar el daño oxidativo de las biomoléculas. Los compuestos con actividad

antioxidante más conocidos son vitaminas (C y E), carotenoides, xantofilas y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos) [12], [48].

Existen un gran número de estudios que avalan el efecto beneficioso de estos pigmentos en la salud humana por lo que hoy en día ocupan un papel fundamental en la dieta. En la familia de los carotenoides el color naranja se asocia a la presencia del β -caroteno y el rojo al licopeno; respectivamente [71].

Los resultados fueron expresados en cianidina-3-glucósido según el autor Winkel [49], esta proporciona el mayor poder radical lo que otorga una mayor capacidad antioxidante. Por otro lado, Del Valle *et al.* [50], indicó que existen 6 tipos de antocianinas que se encuentra en mayor proporción en la naturaleza como: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delfinidina (Df).

Polifenoles.

Los polifenoles son compuestos fitoquímicos derivados del metabolismo secundario de las plantas, se localizan en los alimentos vegetales con una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Presenta función biológica de defensa ante el estrés, sistematizando la función de las enzimas y la estimulación de los receptores de las células debido a las propiedades antioxidantes ya que son necesarias para las funciones fisiológicas vegetales. A través de las rutas del ácido siquímico y del poliacetato, estos componentes favorecen a la resistencia de microorganismos e insectos, preservando la integridad por continua exposición a agentes de estrés ambiental, radiaciones ultravioletas y temperaturas altas. Los polifenoles, son responsables del gusto tan amargo de los chocolates, sin embargo, estos se reducen de manera drástica si el cacao se somete a un proceso químico llamado alcalinización [51], [52].

Flavonoides.

Los flavonoides forman parte de gran cantidad de metabolitos con diferentes clases dependiendo con el nivel de oxidación de su anillo pirano. Desde las vías laterales a la fotosíntesis, las plantas originan metabolitos secundarios, que poseen funciones no nutricionales y de gran importancia para la supervivencia. Estos compuestos son importantes para protegerse de los factores externos. Estos compuestos, tienen efectos anticancerígenos, antioxidantes y propiedades medicinales por la prevención de la formación de tumores

malgnos. Además, protegen de la inflamación, aumentando la acción de distintas sustancias activas y el bloqueo de los radicales libres. Poseen la capacidad de incrementar el color de las hojas y las flores [53].

Los Flavonoides totales son compuestos biológicos encontrados en las plantas, aportan pigmentación a los vegetales y presentan una función de proteger al organismo y a las plantas del daño ocasionado por agentes oxidantes externos (contaminación y luz UV) y el uso indiscriminado de aditivos en alimentos [54].

Antocianinas.

Las antocianinas son pigmentos naturales perteneciente al grupo de los polifenoles que son responsables del color violeta, rojo y naranja de las plantas. Es un metabolito secundario, un glucósido de antocianidina que en su composición posee una aglicona fusionada a un azúcar, mediante un enlace glucosídico. En las plantas, las antocianinas despliegan diversas funciones y en los humanos actúan como antioxidantes y agentes terapéuticos que protegen de la oxidación del colesterol LDL. Presentan muchas propiedades para los sistema inmune, circulatorio y cardiovascular, con efectos inhibidores del desarrollo tumoral, causando la apoptosis de las células cancerosas. Mientras más oscura es la planta, mayor cantidad de compuestos polifenólicos o flavonoides contiene. [53].

Caracterizados por su hidrosolubilidad, son perceptibles por la vista humana, estos pigmentos son llamados específicamente como flavonoides fenólicos [55]. El interés científico por el estudio de las antocianinas se ha incrementado considerablemente en los últimos años debido a su capacidad reductora de enfermedades coronarias, en la prevención del cáncer y diabetes. Son potenciales reemplazantes de los colorantes artificiales [56].

Carotenoides.

Los carotenoides son compuestos tetraterpenoides hallados de manera natural en numerosas frutas y verduras del reino vegetal en animales y también bacterias, caracterizados como pigmentos orgánicos liposolubles con la peculiaridad de otorgar la mayoría de las tonalidades verdes, anaranjadas o rojas. Los carotenoides son asociados con la acción inhibidora de varias enfermedades, esto ha despertado un interés en el estudio de la bioextracción de estos compuestos de sus fuentes. Entre los más destacables están el licopeno que da el color rojo a los tomates y varias frutas como la sandía, y el β -caroteno

que es funciona como prevención de las quemaduras solares y que se complementa muy bien con otros tipos de carotenoides y agentes antioxidantes [57], [58].

2.2.7. Antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos que ayudan a la conservación de la salud humana mediante su acción frente al perjuicio causado por agentes externos como los rayos UV, contaminación ambiental y sustancias químicas. Estos compuestos, se hallan en los alimentos, imposibilitando que otras moléculas se adhieran al oxígeno, combatiendo a los radicales libres, una sustancia antioxidante es capaz de sacrificar su propia integridad para combatir mutaciones y los efectos en otras moléculas del organismo [12].

2.2.8. Función de los antioxidantes.

Los alimentos nutraceuticos, en su capacidad nutricional cuentan con la propiedad de proteger estructuras del organismo ante la formación de radicales libres que surgen a partir de la oxidación celular. Están directamente relacionados con el envejecimiento fisiológico y deriva en enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson y cáncer. Los antioxidantes ayudan con la prevención y la ralentización de las reacciones de oxidación en las células de las cuales se forman los radicales libres [59]. Por lo que, la funcionalidad de los antioxidantes para neutralizar el efecto negativo en el organismo se describe en la Figura 11.

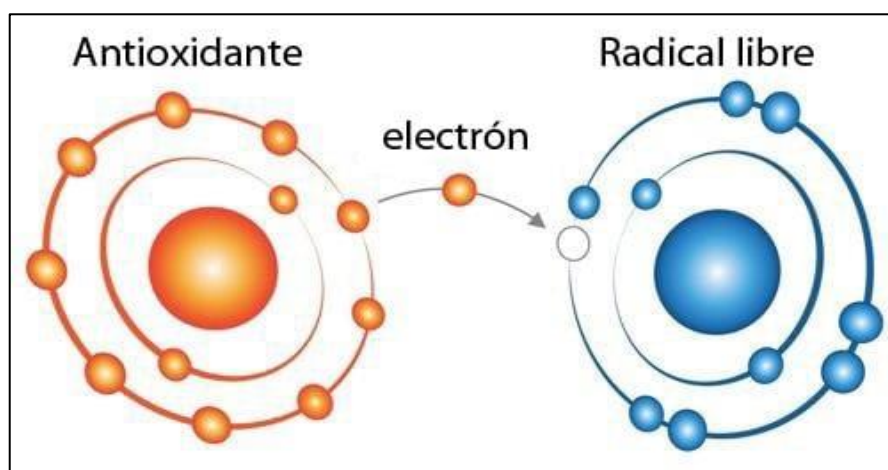


Figura 11. Relación estabilizante/neutralizante de un antioxidante ante un Radical libre.

Fuente: [60].

2.2.9. Radicales libre.

Se llaman radicales libres a las moléculas que diariamente aparecen en el organismo como resultado de las reacciones biológicas que causan las células. Son moléculas reactivas, importantes para ejecutar determinadas funciones y conservar el estado de salud. Estas reacciones son importantes como la “respiración celular”; sin embargo, una elevada producción de radicales libres genera efectos negativos, porque altera las membranas de las células y el material genético (ADN de la célula). El promedio de vida que tiene un radical libre es de microsegundos, causando daño celular en esa longitud de tiempo[61].

2.2.10. Métodos analíticos

La capacidad antioxidante de algunos pigmentos con propiedad antioxidante es analizada por diferentes métodos in vitro, como el ABTS⁺ y FRAP:

Método ABTS⁺.

Esta técnica está basada en parámetros de decoloración del radical ABTS⁺ donde se percibe la decoloración del radical libre, a través de la utilización del radical catiónico 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) que se encuentra expuesto a la presencia de una sustancia antioxidante. La coloración durante la reacción del ABTS⁺ se torna desde un color verde azulado hasta el amarillo, esta coloración es medida mediante un espectrofotómetro UV-VIS. La fuente de radicales para la reacción debe ser preparada con anticipación con persulfato de potasio o dióxido de manganeso [62].

Es una metodología para la determinación de la capacidad antioxidante donde se emplea el radical catiónico 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). El principio se basa en la decoloración del radical libre ABTS⁺ que demuestra la presencia de compuestos con capacidad antioxidante en el objeto estudiado [63].

Método FRAP.

El método del Poder Antioxidante de la Reducción Férrica o también llamado FRAP en inglés, es una técnica en la que se mide la capacidad de los compuestos antioxidantes para reducir el complejo de tripiridiltriazina férrica ($\text{Fe}^3 - \text{TPTZ}$) a complejo ferroso azul ($\text{Fe}^2 - \text{TPTZ}$). La tonalidad azul es el resultado que determina la cantidad de hierro reducido que se relaciona con la capacidad antioxidante de la muestra estudiada (593 nm) [62].

Conocido también como el método del Poder antioxidante de la reducción férrica o por sus siglas FRAP, esta técnica usa la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el complejo de tripiridiltriazina férrica ($\text{Fe}^3\text{-TPTZ}$) hasta complejo ferroso azul ($\text{Fe}^2\text{-TPTZ}$), debido a la actividad antioxidante de electrones donadores [63].

Ventajas y desventajas de métodos de análisis de capacidad antioxidante (ABTS⁺ y FRAP).

Las ventajas y las desventajas de la aplicación de los métodos ABTS y FRAP para determinar la capacidad antioxidante son estipulados en la Tabla 2.

Tabla 2. *Ventajas y desventajas de métodos de análisis de capacidad antioxidante (ABTS y FRAP)*

Método	Ventajas	Desventajas
ABTS ⁺	▪ Método sencillo y eficiente, prevé reacciones no deseadas y no requiere de condiciones drásticas. ▪ Es soluble en medio acuoso y no se ve afectado por la fuerza iónica.	▪ El tiempo que toman los productos hasta tomar su punto final.
FRAP	▪ Es un método eficaz y barato en poco tiempo. ▪ No requiere equipo especializado. ▪ Esta técnica se puede realizar de forma manual en laboratorio.	▪ La actividad reductora no es necesariamente a causa de actividad antioxidante. ▪ Es incapaz de detectar compuestos radicales de transferencia de hidrógeno mediante este método.

Fuente: [64].

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

El desarrollo del proyecto investigativo se realizó mediante la colaboración entre el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, donde se desarrolló el trabajo de campo para determinar las propiedades funcionales de la placenta de cacao procedente de los materiales del Clon CCN-51 y cacao tipo Nacional x Trinitario (Tabla 3).

Tabla 3. Localización del trabajo experimental

INVESTIGACIÓN	LOCALIZACIÓN
Preparación de la muestra	Recolección y muestreo: Asociación de Agricultores “La Cruz”, Mocache, Los Ríos.
Análisis de contenido de antioxidantes	Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

3.2. Tipos de investigación.

Para la realización del trabajo se aplicó investigación exploratoria dado que existe escasa información acerca de la actividad antioxidante en placenta de cacao e investigación experimental para analizar la actividad antioxidante dentro de este amplio campo aún desconocido aplicando metodologías tales como ABTS⁺ Y FRAP.

3.2.1. Investigación Exploratoria.

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

3.2.2. Investigación experimental.

La investigación experimental, permitió evaluar la actividad antioxidante de placenta de cacao de las variedades Clon CCN-51 y cacao tipo Nacional x Trinitario, mediante los métodos ABTS⁺, y FRAP.

3.3. Método de investigación.

3.3.1. Método inductivo – deductivo.

El desarrollo del proyecto de investigación se utilizó el método inductivo-deductivo tomando como base del problema la escasa economía circular aplicada en la cadena de beneficio del cacao. Este método permitirá identificar como solucionar el aprovechamiento de los residuos y compuestos bioactivos presentes en la placenta de cacao.

3.3.2. Métodos estadísticos.

La evaluación estadística de los resultados se realizó mediante la aplicación de un software libre, por el cual se realizará el cotejo de los datos obtenidos en el laboratorio.

3.4. Fuentes de recopilación de información.

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

3.4.1. Fuentes primarias.

Las fuentes primarias de información que se ejecutó para el desarrollo de este proyecto de investigación estuvieron compuestas por trabajo de campo y análisis de laboratorio mediante:

- Caracterización de compuestos bioactivos
- Caracterizar estos residuos y darle valor agregado
- Análisis fisicoquímico y funcional

3.4.2. Fuentes secundarias.

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

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

3.5. Diseño de la investigación.

En esta investigación se utilizó la prueba “t” de student con la finalidad de evaluar el efecto de la variedad sobre el contenido de antioxidantes totales y la actividad antioxidante medida por los métodos ABTS⁺ y FRAP. Para el estudio se plantearon las siguientes hipótesis experimentales:

- **H₀:** $\mu_1=\mu_2$: No existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario) en la actividad antioxidante.
- **H₁:** $\mu_1\neq\mu_2$: Existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario) en la actividad antioxidante.

Para el análisis de los resultados se consideró un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0,05$), empleando el siguiente arreglo factorial (Tabla 4).

Tabla 4. *Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao*

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

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

El análisis estadístico de la placenta de cacao se realizará siguiendo el mismo tratamiento estadístico de los datos, de forma independiente.

3.5.1. Esquema del análisis de varianza.

En la Tabla 4, se presenta el esquema del ANDEVA para la prueba “t” de Student de dos muestras emparejadas. Mediante el estadístico “t” de Student, se evaluó el efecto de la variedad de cacao en el contenido de antioxidantes y la actividad antioxidante de las muestras de placenta en estudio.

Tabla 5. Prueba “t” de Student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (Clon CCN-51 y tipo Nacional x Trinitario) en el contenido de actividad antioxidante en placenta de cacao.

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

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

3.5.2. Análisis de correlación de Pearson.

Para identificar los compuestos antioxidantes responsables de la capacidad antioxidantes de las muestras de placenta de cacao, se utilizó un análisis de correlación de Pearson (Tabla 6). Esto permitió establecer el grado de correlación que existe entre polifenoles, flavonoides, carotenoides y antocianinas con la actividad antioxidante in vitro de las muestras de placenta de cacao estudiadas de forma independiente.

Tabla 6 – Matriz de correlación para relacionar el contenido de antioxidantes totales (polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas) y actividad antioxidante en residuos de cacao.

CAPACIDAD	CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS			
	Polifenoles	Flavonoides	Carotenoides	Antocianinas
ABTS ⁺	r_{wp}	r_{wf}	r_{wc}	r_{wa}
FRAP	r_{yp}	r_{yf}	r_{yc}	r_{ya}

$w = \text{ABTS}^+$, $y = \text{FRAP}$, $p = \text{Polifenoles}$, $f = \text{Flavonoides}$, $c = \text{Carotenoides}$, $a = \text{Antocianinas}$

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

3.6. Instrumentos de la investigación.

Variables de estudio

Variables independientes.

- Clon CCN-51(Placenta)
- Cacao tipo Nacional x Trinitario (Placenta)

Variables dependientes.

Contenido de antioxidantes totales

- Polifenoles
- Flavonoides
- Carotenoides
- Antocianinas

Actividad antioxidante in vitro

- ABTS⁺ - captación de radicales catiónicos
- FRAP - radicales férricos o metálicos

3.6.1. Material vegetal.

Para la obtención de placenta se tomará muestras de cacao de la colección perteneciente a la Asociación de Agricultores “La Cruz”, ubicado en el cantón Mocache (Km 7 ^{1/2}, vía Mocache – Jauneche), provincia de Los Ríos. El muestreo se realizará escogiendo aleatoriamente árboles de cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN-51.

3.6.2. Recolección de muestras.

Las mazorcas de cacao fueron recolectadas directamente en los campos pertenecientes a la colección de la asociación La Cruz. Durante el proceso postcosecha, se apertura las mazorcas para obtener los granos en baba que se llevaron a un proceso de fermentación en cajas de madera. A medida que se realizó el proceso de desgrane, se fue separando placenta y se almaceno en frío en envases plásticos con cierre hermético protegidos de la luz y el oxígeno. Las muestras enfundades se llevaron a congelación para luego trasladarlos a los laboratorios de la Estación Experimental Santa Catalina para la caracterización fisicoquímica y funcional [65].

3.6.3. Preparación de las muestras.

Para la caracterización fisicoquímica y funcional de la placenta de cacao, se congeló las muestras (Nacional x Trinitario y CCN-51) a -18°C, para luego ser liofilizados a -80°C. Una vez liofilizadas las muestras, fueron molidas, tamizadas y almacenadas a en recipientes de vidrio aislados de la luz y el oxígeno, para su conservación y posterior caracterización funcional [65].

3.6.5. Antioxidantes totales.

Contenido total de antocianinas (TAC).

El contenido de antocianinas totales se determinó mediante el método utilizado por [65]. El tratamiento de la muestra seca de placenta se hizo pesando una fracción de esta, y la extracción se realizó mediante una solución tampón (HCl 0,2 N y NaCl 0,2 N) con un pH de 1.0. Posteriormente se agitó en un vórtice (Multi-Mixer Illinois, Estados Unidos), luego al baño ultrasónico (Cole-Palmer 8892-MTH; Illinois, Estados Unidos), y finalmente centrifugada. Se realizó el mismo procedimiento, pero la solución tampón a un pH de 4.5 (CH₃COONa 1M y HCl 0,1 M).

Para la lectura el extracto resultante se trasladó a una celda para medir la absorbancia a 510 y 700 nm respectivamente mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-vis 2.600 (Kyoto, Japón).

Contenido total de carotenoides (TCC).

El contenido de carotenoides totales se medirá en ausencia de luz y oxígeno, usando 0,6–1,0 g de la muestra liofilizada. La extracción se realizó utilizando 50 mL de una mezcla de solventes compuesta por hexano 50%, etanol 25%, acetona 25% (v/v/v), 0,1% butilhidroxitolueno (BHT) (p/v) y 5 g cloruro de calcio de (p/v). Estos elementos se agregarán gradualmente. La extracción se realizó durante 20 min en un baño de agua refrigerado a 4 °C, posteriormente se separó las fases orgánica e inorgánica del extracto mediante la adición de 15 mL de agua destilada y se deja reposar durante 10 min. El extracto se filtró y se transfirió a un embudo de decantación, donde se eliminó la fase inorgánica. El extracto etéreo se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL y se enrazó con la solución extractante. El contenido de carotenoides totales se determinó por espectrofotometría UV-VIS Shimadzu, modelo 2200 (Kioto, Japón) a 450 nm [66]. Los resultados se expresaron en µg de β-caroteno/g de peso seco (PS).

3.6.4. Propiedades funcionales

Extracción de compuestos bioactivos.

Para la extracción de los componentes fenólicos de la placenta de cacao se pesó 0,3 g de subproducto liofilizado y se añadió 5 mL de una disolución formada de metanol, agua y ácido fórmico (70:30:0,1 %; v/v/v). La extracción fue un proceso que duró cinco ciclos complementados entre agitación (agitador-incubador VWR, USA) e inmersión en un baño de ultrasonidos (baño de ultrasonido Selecta; Barcelona, USA) durante 5 y 10 minutos, respectivamente. Posteriormente la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 4400 rpm (centrífuga Chermle Z320; Alemania). El extracto bruto resultante de cada ciclo de extracción se recolectó en un matraz volumétrico y se trasvasó a un matraz aforado a 25 mL con la disolución extractora. La disolución obtenida se empleó para la cuantificación de componentes fenólicos, perfil fenólico y capacidad antioxidante en los métodos propuestos [65].

Contenido total de polifenoles (TPC).

Para la determinación del contenido de Polifenoles Totales se midió empleando una fracción de extracto y se hizo reaccionar con el reactivo de Folin- Ciocalteu y Na_2CO_3 al 20%. La cuantificación de polifenoles en las dos muestras de placenta se realizó a través de un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 2.600 Kyoto, Japón, con una longitud de onda de 760 nm. Los datos resultantes se compararon frente a una curva de calibración ($y = 0.0085x + 0.0975$, $R^2 = 0.9989$) de ácido gálico (0 a 100 ppm) medidas en triplicado durante tres días ($n = 9$). El contenido de polifenoles totales es expresado en mg de ácido gálico (GAE) por cada 100 g de muestra en base seca (BS) Samaniego *et al.* [67].

Flavonoides totales.

La determinación del contenido de flavonoides totales (TFC) se midió por espectrofotometría UV-Vis (Shimadzu, Kyoto, Japón) [68]. Para la cuantificación se tomó una alícuota de extracto fenólico y se hizo reaccionar con Nitrato de Sodio, Cloruro de Aluminio e Hidróxido de Sodio y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm frente a una curva de calibración de catequina ($y = 0.0036x + 0.0678$, $R^2 = 0.9994$) medida por triplicado durante 3 días ($n=9$). La información resultante se expresó en mg de catequina por cada 100 g de peso en base seca (BS) [65].

3.6.6. Actividad antioxidante.

Actividad antioxidante ABTS⁺.

La capacidad antioxidante por el método del ABTS⁺ se determinó por espectrofotometría UV-VIS a 734 nm [69], empleando una curva estándar de Trolox (0-800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados se expresaron en μM de Trolox equivalentes ($\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$) de muestra seca.

Actividad antioxidante FRAP

La capacidad antioxidante por el método FRAP se determinó por tecnología espectrofotométrica UV-Vis. Mediante esta técnica es posible la cuantificación de la capacidad reductora del hierro, con este parámetro se realizó una reacción colorimétrica y se midió a 700 nm, empleando una curva estándar de Trolox (0-700 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) [70]. Los resultados se reportan como mM Trolox equivalentes ($\text{TE}\cdot\text{g}^{-1}$) de muestra seca.

3.7.2. Diagrama de proceso experimental

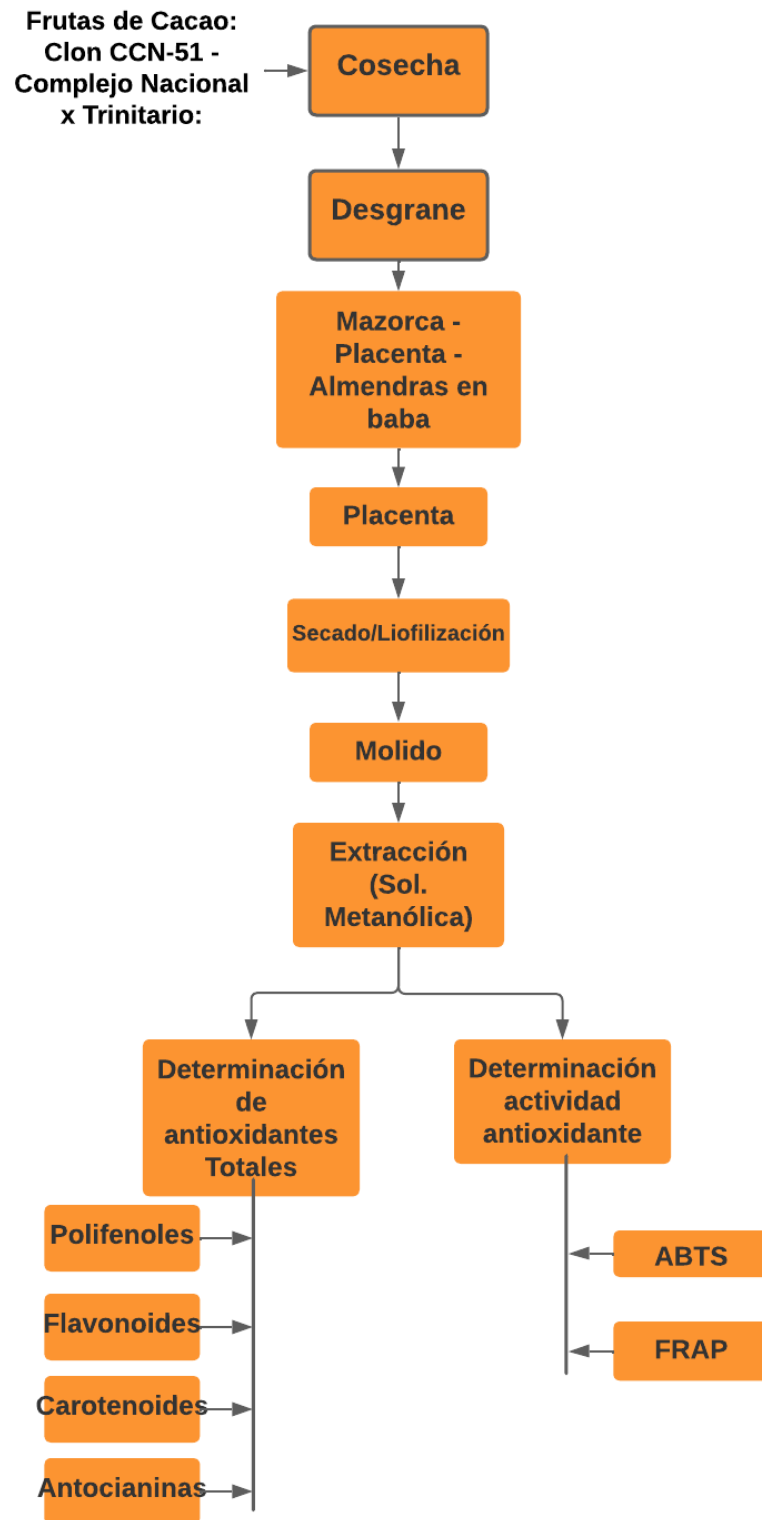


Figura 12. Diagrama de proceso experimental

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

3.7. Tratamiento de datos.

El análisis de resultados de la investigación se realizó a través de un software estadístico de uso libre, mediante una prueba “t” de Student de dos muestras emparejadas, con el objetivo de corroborar el efecto de la variedad de la placenta (tipo Nacional x Trinitario y Clon CCN-51) sobre el contenido de antioxidantes y la actividad antioxidante. Para conocer los componentes responsables (polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas) de la actividad antioxidante medida por ABTS⁺ y FRAP, de la placenta cacao se empleó un análisis de correlación de Pearson.

3.8. Recursos Humanos y Materiales.

3.8.1. Recursos Humanos.

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

- Ing. Jaime Fabián Vera Chang MSc. Director del proyecto de investigación. (UTEQ)
- Dr. Iván Samaniego Maigua PhD. Codirector del proyecto de Investigación. (INIAP)
- Ing. Wilma Llerena Silva MSc. Directora del proyecto de Investigación. (UTEQ).

3.8.2. Materiales.

Materia prima.

- Placenta de cacao Clon CCN-51
- Placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario

Materiales de laboratorio.

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

- Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL
- Espátula
- Termómetro
- Micropipetas 100-1000 μ L y 1-10 mL
- Puntas para micropipeta 100-1000 μ L y 1-10 mL
- Pissetas
- Gradillas
- Frascos de vidrio color ámbar.
- Microplacas negras

Reactivos.

- Ácido fórmico (pureza 99 %)
- Ácido gálico estándar (pureza 98 %)
- Etanol (grado analítico 99,9 %)
- Hexano (ACS, 98 %)
- Metanol grado analítico (98 %)
- Acetato de potasio (pureza 99 %)
- Hidróxido de sodio (pureza 99 %)
- Agua destilada
- Agua bidestilada
- ABTS⁺
- Fosfato de sodio monobásico

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

Equipos.

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

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

Los resultados de las evaluaciones realizadas en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del INIAP, se realizó empleando métodos previamente validados, como se detalla a continuación:

4.1.1. Antioxidantes totales

Antocianinas

La Figura 13, presenta los valores de concentración de antocianinas totales en las muestras de placenta de cacao del tipo Nacional x Trinitario y clon CCN- 51.

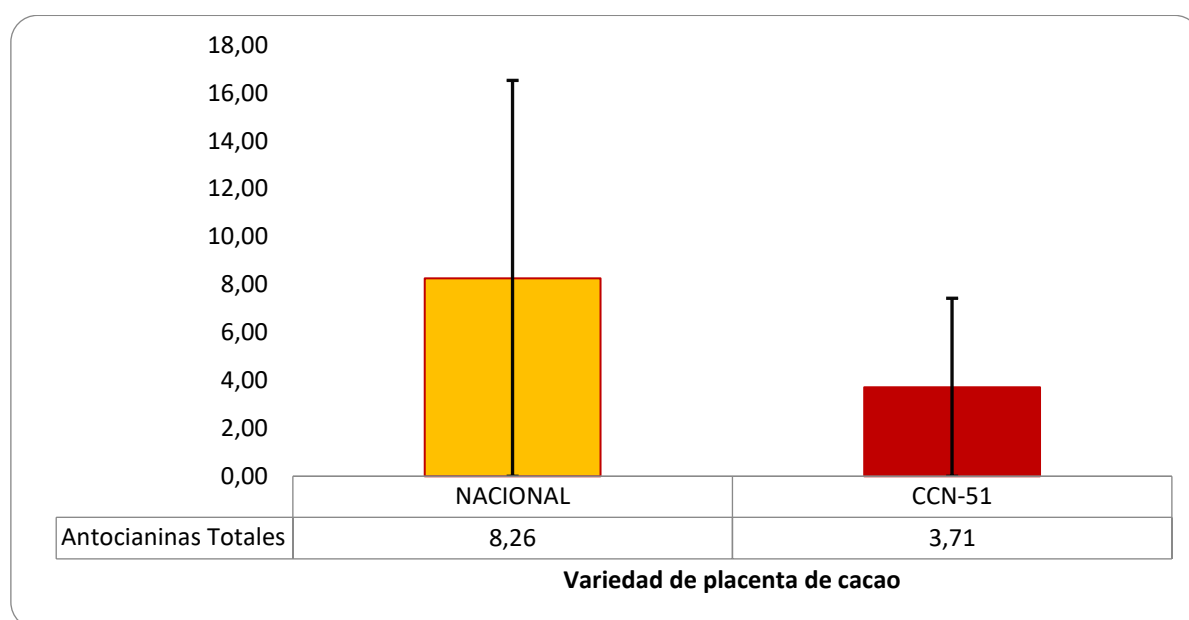


Figura 13. Contenido de antocianinas totales en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario (■) y clon CCN-51(■).

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 13, la cantidad de antocianinas totales en la placenta de cacao del tipo Nacional x Trinitario (8,26 mg cianidina-3-glucósido•g⁻¹) es superior a la concentración del clon CCN-51 (3,71 mg cianidina-3-glucósido•g⁻¹). Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7) que evidencien un efecto de la variedad de procedencia de los residuos de cacao (acepta H_0), presentando un valor $t_{\text{student calculado}}$ inferior (4,48) al valor de $t_{\text{crítico}}$ (6,314). A pesar de que la concentración de antocianinas totales es mayor en las placentas del tipo Nacional x Trinitario, la falta de variabilidad en los resultados puede atribuirse a diversos factores como la preparación de la

muestra o la concentración del analito, que al encontrarse en bajas cantidades puede estar cerca de su límite de detección. Así también, por las características de la placenta que carece de color, presentó un bajo contenido de antocianinas, sin embargo, estos compuestos se encuentran en mayor concentración en otras partes del fruto como: mecanismo de defensa a la exposición de la luz UV; actuando como fotoprotectores de las plantas [71]

Tabla 7 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para antocianinas totales.

	Nacional	CCN-51
Media	8,260794241	3,714464334
Varianza	5,360209912	1,42898824
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	1	
Diferencia hipotética de las medias	1	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	4,478678488	
P(T<=t) una cola	0,069925317	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,139850634	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	
Significancia		No significativo

Elaborado por: Oscar Chumaña, 2022.

Al comparar los resultados obtenidos de placenta de cacao con los resultados reportados por Lessa *et al.*, 2018 [72], para muestras de mazorca de cacao, se encontró una diferencia notable, hallando una cantidad de compuestos antociánicos (4 mg quercetina•g⁻¹) similar a la reportado para placenta de cacao procedente de la variedad CCN-51.

De igual manera, al comparar los valores obtenidos en este estudio con el trabajo desarrollado por Nazario *et al.*, 2014 granos de cacao secos de tipo Criollo y siete clones variedades provenientes de la estación experimental Juan Benito del ICT [73]. Estas muestras presentaron concentraciones entre 0,424 y 0,425 mg cianidina-3-glucósido•g⁻¹ de para cacao Criollo y muestras del clon CCN-51. Según el trabajo desarrollado por Ordoñez *et al.*, 2014 [73] existe un efecto del método de extracción (maceración con metanol/cloroformo 1:2), confirmando que las almendras de cacao son pobres en antocianinas , independientemente del origen de las muestras .

Carotenoides

En la Figura 14, se presenta la concentración de carotenoides totales en muestras de placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN- 51.

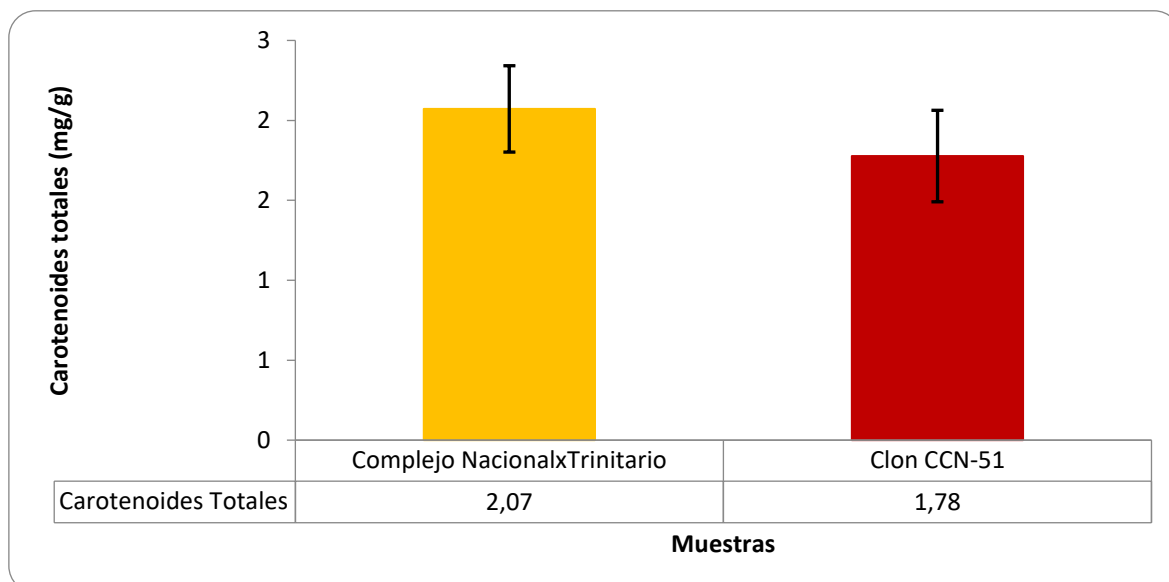


Figura 14. Contenido de carotenoides totales en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario(■) y clon CCN-51(■).

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 14, la placenta de cacao del tipo Nacional x Trinitario presenta una mayor cantidad de carotenoides totales ($2,07 \text{ mg } \beta\text{-caroteno} \cdot \text{g}^{-1}$) frente al clon CCN-51 ($1,78 \text{ mg } \beta\text{-caroteno} \cdot \text{g}^{-1}$). La variación encontrada entre las muestras puede deberse a que los carotenoides son compuestos responsables de la pigmentación amarilla, anaranjada y roja de un gran número de estructuras como plantas, algas, hongos y bacterias, además de animales como los ovíparos, reptiles, insectos, cangrejos, langostas y camarones [74]. De tal manera que, al considerarse que la variedad Nacional, se caracteriza por presentar una coloración amarilla, el pigmento puede acumularse en mayor medida en esta variedad que en el cacao CCN-51, tanto en el fruto como en residuos, incluyendo la placenta. Los valores obtenidos (Tabla 8) demuestran que existe un efecto de la variedad (rechazo H_0), con un $t_{\text{student calculado}}$ inferior (25,91) al valor de $t_{\text{crítico}}$ (6,31), como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para carotenoides totales.

	Nacional	CCN-51
Media	2,071775643	1,77676397
Varianza	0,072916224	0,08187325
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	25,90563826	
P(T<=t) una cola	0,012281185	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,024562369	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	
Significancia		Significativo

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

De acuerdo con el trabajo de investigación, desarrollado por Lessa *et al.*[72], muestras de mazorca de cacao fresco originarias de Ilhéus – Bahía (Brazil), presentaron concentraciones de carotenoides totales de 0.8 ± 0.03 mg β -caroteno•g⁻¹. Estos valores fueron inferiores a las concentraciones reportadas en este estudio, para muestras de placenta de cacao del tipo Nacional x Trinitario (2,07 mg β -caroteno•g⁻¹) y CCN-51 (1,78 mg β -caroteno•g⁻¹). La variación en los contenidos de este antioxidante, respecto a lo estudiado por diferentes autores Hernández *et al*, 2019,. Murillo 2020 [75], [76], puede deberse al efecto de la zona de procedencia, la variedad y el método de extracción empleados . Por lo que, en investigaciones realizadas en mazorca de cacao, donde se ha trabajado con el uso de tecnologías emergentes como fluidos supercríticos (dióxido de carbono) y otros métodos de extracción (solución alcohólica de hidroetanol 8:2; v/v) se reportó concentraciones de 64,35 mg β -caroteno•g y 0.8 ± 0.03 mg β -caroteno•g⁻¹, en ese orden. Lo que demuestra el efecto del método de extracción en la concentración de este tipo de antioxidantes.

De igual manera, al comparar los resultados de esta investigación con otros estudios realizados en residuos de cacao, se evidenció que los antioxidantes, son compuestos que pueden acumularse en distintas partes del fruto. Por lo que se encontró carotenoides en muestras de cascarilla de cacao en concentraciones entre 0,079 (cacao Criollo) y 0,06 (mg β -caroteno•g⁻¹ (cacao CCN-51) . Sin embargo, dependiendo del tipo de residuo, la zona de procedencia (Pichanaki y Satipo; Junín, Perú) y la variedad, estos valores pueden variar significativamente.

Polifenoles Totales

El contenido de polifenoles totales de placenta de cacao, procedentes de materiales del tipo Nacional x Trinitario y CCN-51, se determinó por método de la curva patrón, donde se realizó la validación de la recta de calibración, utilizando ácido gálico como estándar, como se muestra en la Figura 15.

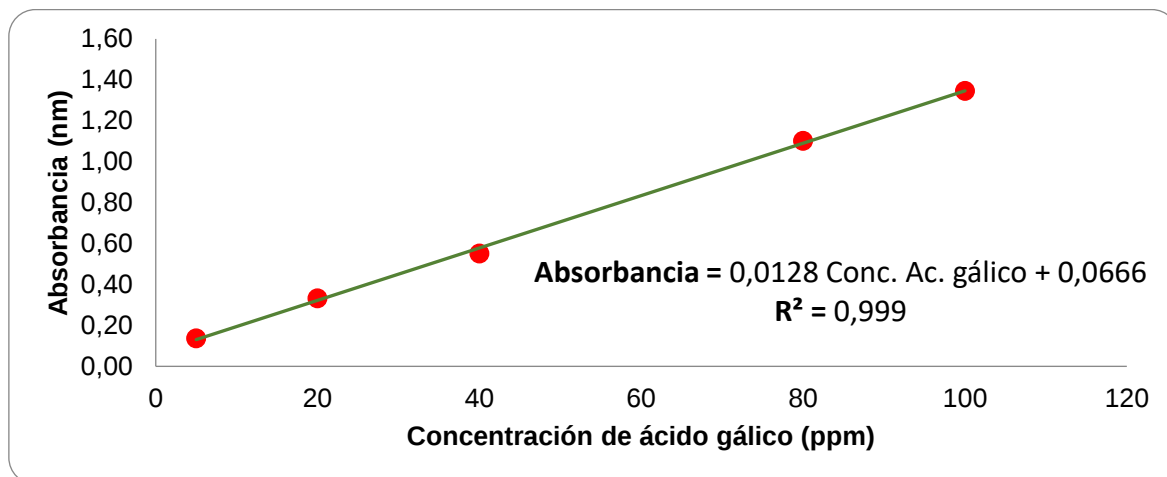


Figura 15 - Curva de calibración promedio para la determinación de contenido de Polifenoles Totales en placenta de cacao de dos variedades.

La curva de calibración promedio para la determinación del contenido de polifenoles totales, demostró un ajuste lineal de $R^2 \geq 0,999$, mostrando una alta correlación (99,9%) entre la absorbancia de las muestras y la concentración de ácido gálico; determinándose que el equipo y los analistas proporcionan resultados con alta fiabilidad. Los resultados anteriormente presentados en la Tabla 9, son correspondientes a los valores de las curvas de calibración medidas en triplicado.

Tabla 9 - Validación de la curva de calibración de ácido gálico para el método de determinación de polifenoles totales.

Parámetros	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	GLOBAL
m (pendiente)	0,0143	0,0130	0,0111	0,0128
Lo (ordenada al origen)	0,0645	0,0724	0,0630	0,0666
Sy,x (error típico)	0,0295	0,0152	0,0143	0,0196
sm (Desv st pendiente)	0,0004	0,0002	0,0002	0,0002
SLo (Desv. St ordenada)	0,0223	0,0115	0,0108	0,0149
t (student)	3,1824	3,1824	3,1824	3,1824
m(min)	0,0131	0,0124	0,0105	0,0120
m(máx)	0,0155	0,0136	0,0116	0,0136
Lo (min)	-0,0065	0,0357	0,0287	0,0193
Lo (máx)	0,1356	0,1090	0,0974	0,1140

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 9, las curvas de calibración desarrolladas durante tres días de ensayos presentaron una linealidad promedio adecuada, con un valor de $0.128 \pm 0,0002$ y el valor de la ordenada al origen fue de $0,0666 \pm 0,0149$.

En la Figura 16, se presenta la concentración resultante de los análisis de polifenoles totales medidas en muestras de placenta de cacao procedentes de materiales tipo Nacional x Trinitario y clon CCN- 51.

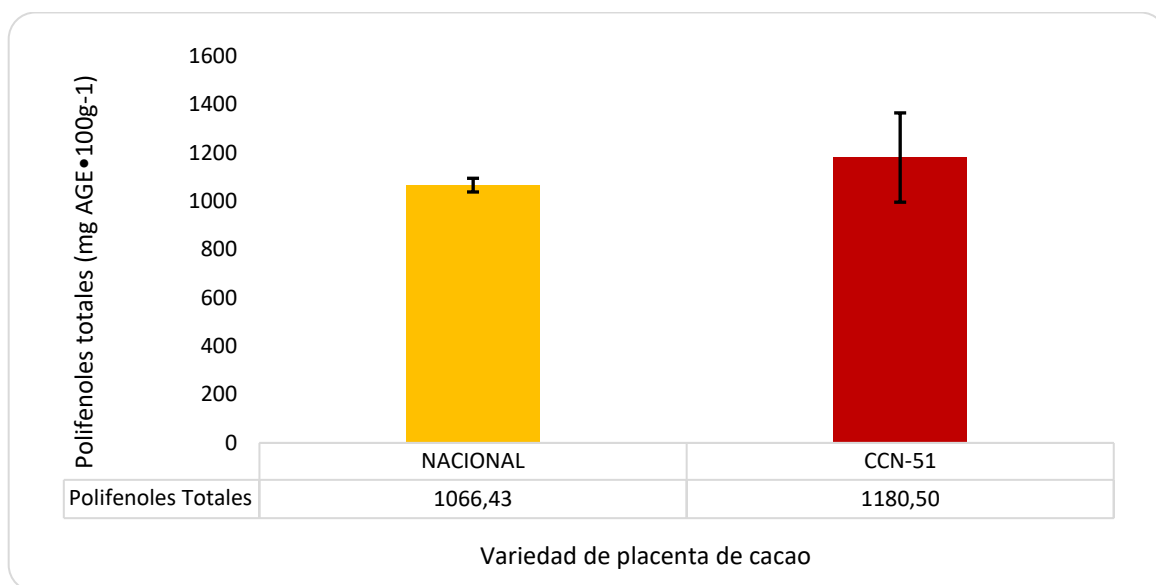


Figura 16 - Contenido de polifenoles totales en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario(■) y clon CCN-51(■) expresado en $\text{mg AGE} \bullet 100\text{g}^{-1}$.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 16, las muestras de placenta de cacao del tipo Nacional x Trinitario presentaron un valor promedio de $1066,43 \text{ mg GAE} \bullet 100\text{g}^{-1}$, inferior a las concentraciones halladas en el clon CCN-51 ($1180,50 \text{ mg GAE} \bullet 100\text{g}^{-1}$). Sin embargo, los valores obtenidos no demuestran una variación estadísticamente significativa (Tabla 10) entre las dos variedades estudiadas (acepta H_0), con un valor $t_{\text{student calculado}}$ inferior ($-0,758$) mayor al valor de $t_{\text{crítico}}$ ($6,31375151$). De acuerdo con investigaciones presentadas por Vázquez *et al.*, 2016 [71], la presencia de polifenoles en frutas se relaciona directamente con el espectro de coloración que va de blanco a marrón, encontrándose particularmente compuestos como proantocianidinas y taninos. Estos se asocian con la sensación de sabor astringente desarrolladas en las almendras de cacao y subproductos [71].

Tabla 10 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para polifenoles totales.

	Nacional	CCN-51
Media	1066,43458	1180,503525
Varianza	798,956946	34109,023
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-0,75753112	
P(T<=t) una cola	0,29363855	
Valor crítico de t (una cola)	6,31375151	
P(T<=t) dos colas	0,58727709	
Valor crítico de t (dos colas)	12,7062047	
Significancia		No Significativo

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

La concentración de los polifenoles funge un rol de protección en la planta de cacao a enfermedades y plagas como la mancha negra, moniliasis y otros causantes de padecimientos fitosanitarios en la planta [71]. Al comparar los resultados obtenidos en placenta de cacao procedente del cantón Mocache (53,0 mg CE•100g⁻¹), con muestras de mucílago CCN-51 procedentes del cantón Montalvo (provincia de Los Ríos). Los resultados obtenidos demuestran que el contenido de polifenoles es superior en muestras de la colección de la Asociación “La Cruz” (Mocache), demostrándose que existe un efecto de la zona (rechaza) de producción y el tipo de manejo agronómico sobre los contenidos de antioxidantes [77].

Así también, los resultados obtenidos en este estudio fueron superiores a los valores reportados por Goude *et al.* [78], [75] quienes reportaron contenidos de polifenoles totales de 26,06 mg GAE•100g⁻¹ para muestras de placenta de cacao sin fermentar de la variedad “Forastero”. Esto confirmaría que las muestras de origen de cacao se caracterizan por presentar contenidos de compuestos bioactivos superiores a muestras procedentes de granjas ubicadas al oeste de Costa de Marfil y de otros sitios de procedencia. Por lo tanto, la diferencia en los resultados puede deberse al tipo de variedad y método de extracción utilizado (metanol e incubación; 25°Cx24 horas).

Flavonoides Totales

En la Figura 17, se reporta el contenido de Flavonoides Totales de placenta de cacao, procedentes de las variedades del tipo Nacional x Trinitario y clon CCN-51. De acuerdo con los valores calculados de las repeticiones realizadas durante 3 días, el ajuste lineal está dentro los parámetros ($R^2 \geq 0,9998$) de linealidad requeridos para una curva de calibración

promedio. Esto demuestra la existencia de una alta correlación entre la absorbancia del ácido gálico y la concentración, lo que demuestra que los análisis fueron realizados con equipos y analistas que brindan información altamente confiable.

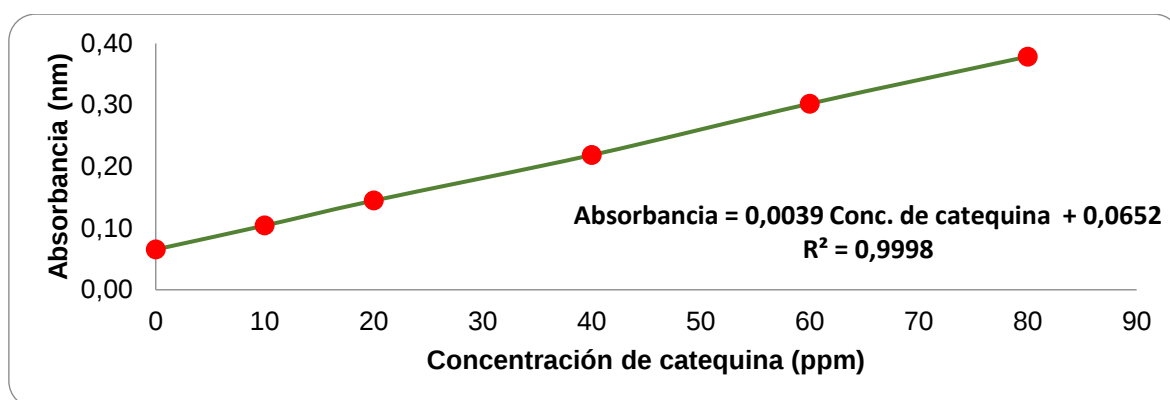


Figura 17. Curva de calibración promedio para la determinación del contenido de Flavonoides Totales en placenta de cacao de dos variedades.

En la Figura 18, se muestra la concentración resultante del análisis de flavonoides totales realizado en muestras de placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN- 51.

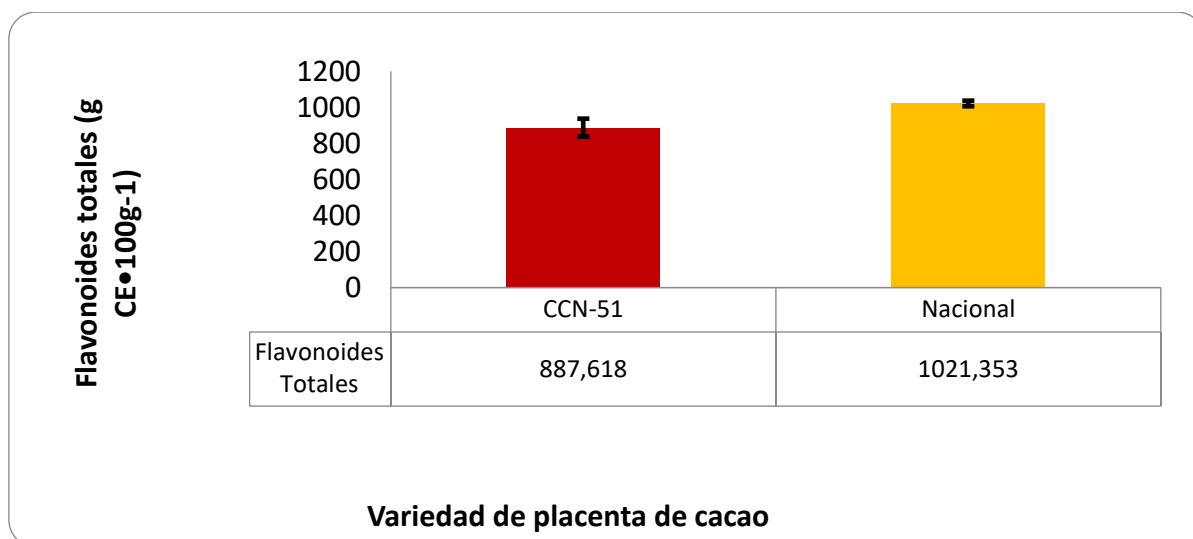


Figura 18. Contenido de flavonoides totales en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario (■) y cacao CCN-51(■) expresado en mg AGE•100g⁻¹.

A diferencia del contenido de Polifenoles Totales (Figura 18), las muestras de placenta de la variedad clon CCN-51 presentaron un menor contenido de flavonoides totales (887,618 mg CE•100g⁻¹) que la variedad tipo Nacional x Trinitario (1021,353 mg CE•100g⁻¹). Demostrando que, en este tipo de antioxidantes, No existe diferencias estadísticamente significativas (Tabla 11) entre las dos variedades estudiadas de placenta de cacao (acepto

H_0), evidenciándose un efecto de variedad del cacao en el contenido de flavonoides totales en el subproducto de cacao, con un valor $t_{\text{calculado}}$ inferior (2,88) inferior al $t_{\text{crítico}}$ (6,314).

Tabla 11. Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para flavonoides totales.

	Nacional	CCN-51
Media	1021,352546	887,6176598
Varianza	240,5572443	2458,551776
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	1	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	2,883773638	
P(T<=t) una cola	0,106249455	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,212498909	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	
Significancia		No Significativo

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

La presencia de flavonoides en frutas como el cacao y en sus subproductos, se debe a que tienen un rol alelopático que tiene la función de inhibir el crecimiento de malezas cerca de la planta. Así también, se les atribuye la capacidad de tolerar el estrés biótico (animales, hongos, bacterias) y abiótico (temperatura, sequía), generando defensas contra la radiación ultravioleta (UV).

La cantidad de flavonoides totales obtenida en esta investigación difieren de manera importante con los valores presentados por Goude y colaboradores [78], para placenta de cacao de la variedad Forastero, quienes reportaron concentraciones de $6,0 \text{ mg CE} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (MS), para muestras tomadas de las granjas de la zona oeste de Costa de Marfil. La variación en los resultados puede deberse a la zona de procedencia y el método de extracción. De la misma manera, en muestras de residuo de cacao CCN-51 tomadas del cantón Montalvo (Ecuador) presentaron una menor concentración de flavonoides totales ($0,088 \text{ mg CE} \cdot 100\text{g}^{-1}$) que en las muestras de placenta de cacao del cantón Mocache [77]. Estos resultados confirman, el estudio realizado por Samaniego y colaboradores, quienes indican que, dependiendo de la zona de producción los contenidos de antioxidantes pueden variar en muestras de cacao ecuatoriano.

4.1.2. Actividad antioxidante

Actividad antioxidante por ABTS⁺

En la Figura 19, se presenta el resultado promedio de las curvas de calibración, medidas durante 3 días. La curva patrón desarrollada, mostró un ajuste lineal de $R^2 \geq 0,9979$, demostrando que existe una alta correlación (99.79%) entre la absorbancia de Trolox y la concentración. Por lo tanto, los análisis fueron realizados en equipos y por analistas que brindan información altamente confiable.

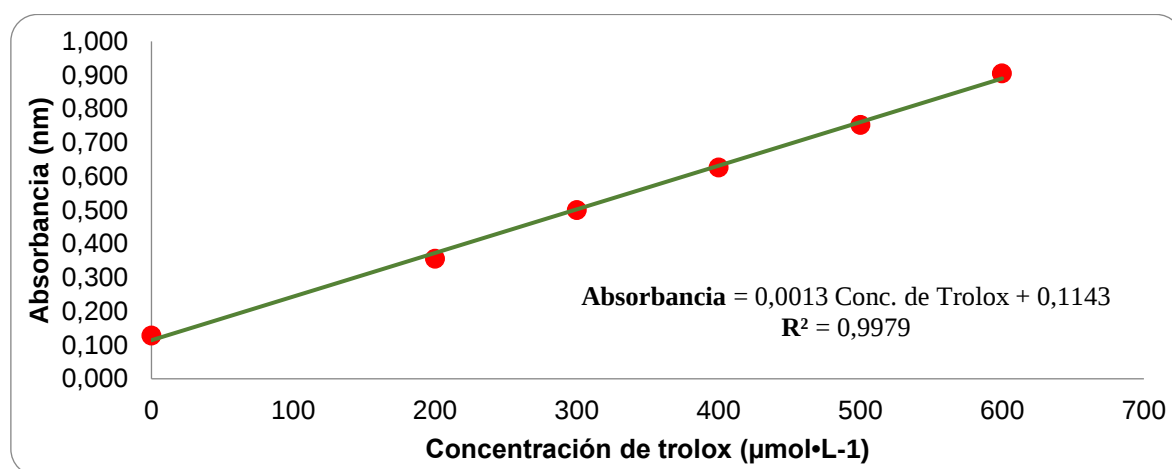


Figura 19. Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método ABTS⁺ en placenta de cacao de dos variedades.

En la Figura 20, se presenta los resultados de la determinación de la actividad antioxidante medida por el método ABTS⁺ en placenta de cacao sin fermentar, procedente de materiales de cacao del tipo Nacional x Trinitario y CCN-51.

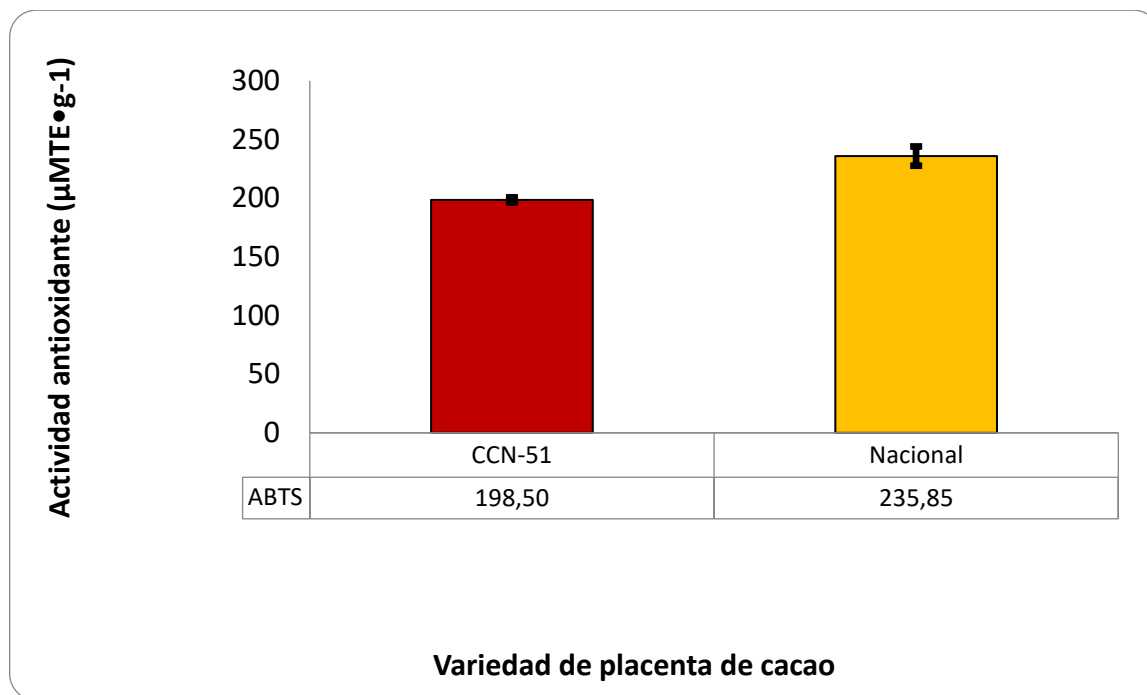


Figura 20. Actividad antioxidante $ABTS^+$ en cacao tipo Nacional x Trinitario (■) y clon CCN-51(■).

La actividad antioxidante de placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario ($235,85 \mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$) fue superior a las muestras del clon CCN-51 ($198,50 \mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$). Sin embargo, los resultados no evidencian un efecto significativo (Tabla 12) de la variedad (aceptoo H_0), en la actividad antioxidante de este subproducto de cacao, con un valor $t_{\text{student calculado}}$ inferior ($5,75$) superior al valor de $t_{\text{crítico}}$ ($6,314$).

Tabla 12 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para actividad antioxidante $ABTS^+$.

	Variable 1	Variable 2
Media	235,848522	198,5003319
Varianza	56,18625003	2,101478552
Observaciones	2	2
Coefficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	1	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	5,746430939	
P(T<=t) una cola	0,054843411	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,109686822	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	
Significancia	No Significativo	

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 20, las muestras de placenta de cacao de la variedad Forastero presentan una menor capacidad antioxidante ($12,73 \mu\text{M TE}\bullet\text{g}^{-1}\text{MS}$) que las muestras de placenta fresca de cacao de los materiales del tipo Nacional x Trinitario y CCN-51, Goude *et al.*, 2019 [78]. Al comparar estos resultados, con el trabajo desarrollado por diferentes autores Da Silva *et al* 2015., Peñaranda 2019 [79], [80] , el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de mucílago ($8,54 \mu\text{M TE}\bullet\text{g}^{-1}$ - $30.8 \mu\text{mol TE/g}^{-1}$) y cáscara de cacao (); respectivamente.

Actividad antioxidante por FRAP

En el análisis de actividad antioxidante por el método FRAP (Figura 21), mediante el método de la curva patrón se validó la recta de calibración utilizando Trolox como estándar las determinaciones se realizaron durante 3 días, reportándose la curva promedio para el análisis.

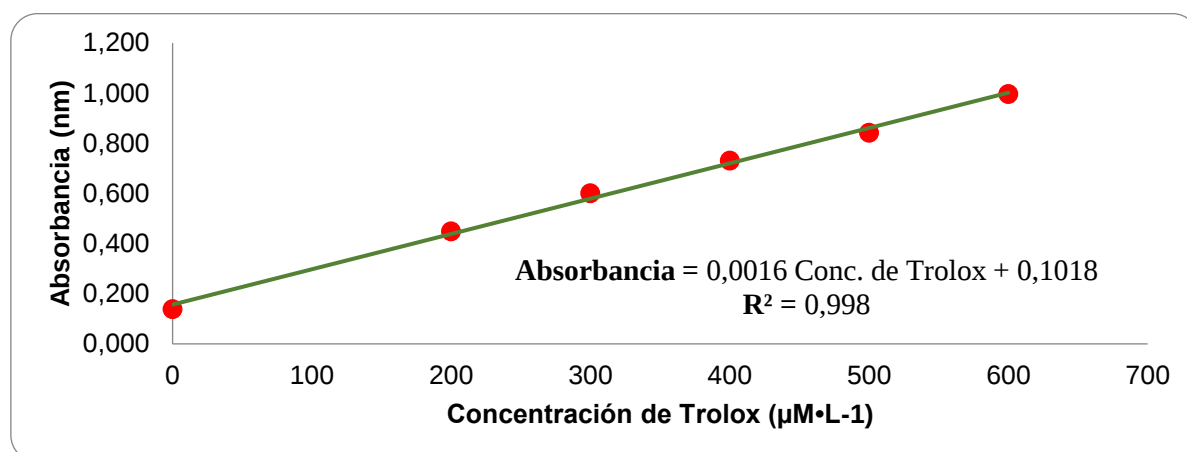


Figura 21. Curva de calibración promedio para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método FRAP en placenta de cacao de dos variedades.

La curva de calibración promedio para la determinación de actividad antioxidante FRAP, demostró un ajuste lineal dentro de los parámetros esperados ($R^2 \geq 0,998$), con un ajuste del 99.80% entre la absorbancia y la concentración de Trolox. Por lo tanto, los resultados obtenidos a través de los análisis realizados con en este equipo y los analistas son altamente confiables.

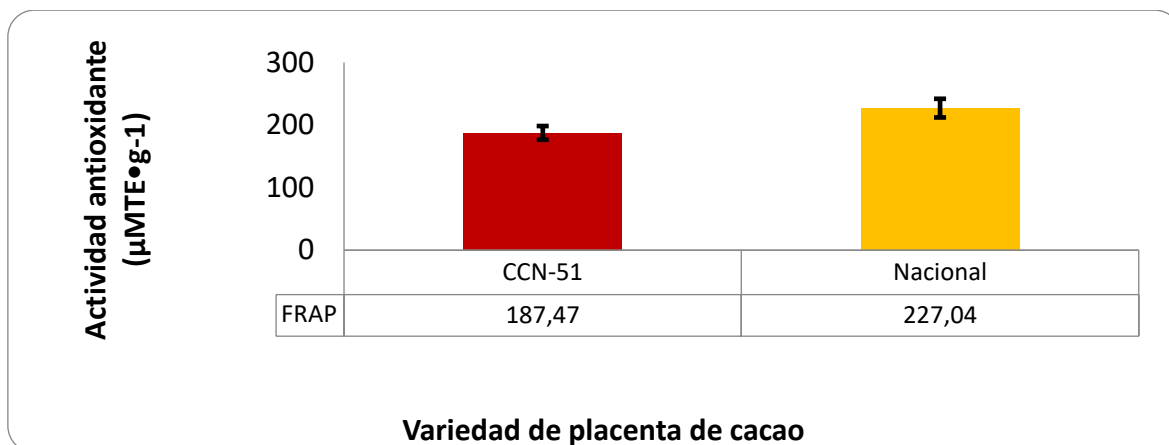


Figura 22. Actividad antioxidante FRAP en placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario(■) y clon CCN-51(■).

De acuerdo con los resultados de la Figura 22, se determinó que la actividad antioxidante medida por el método de FRAP en muestras de placenta de cacao sin fermentar, fue superior en muestras procedentes de cacao del tipo Nacional x Trinitario ($227,04 \mu\text{M TE}\bullet\text{g}^{-1}$), que en el clon CCN-51 ($187,47 \mu\text{M TE}\bullet\text{g}^{-1}$). Estos resultados demuestran que existe diferencias significativas (Tabla 13) entre las dos variedades estudiadas, lo que evidencia un efecto de variedad del cacao en la actividad antioxidante de este subproducto de la cadena cacaotera, con un valor $t_{\text{student calculado}}$ superior (13,82) al valor de $t_{\text{crítico}}$ (6,314).

Tabla 13 - Prueba de "t" para medias de dos muestras emparejadas para actividad antioxidante FRAP.

	Nacional	CCN-51
Media	227,0386496	187,47
Varianza	222,6396927	120,41
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	1	
Diferencia hipotética de las medias	1	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	13,81752926	
P(T<=t) una cola	0,022996578	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,045993156	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	
Significancia		Significativa

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

Los resultados obtenidos en este estudio (Figura 22), demuestran una diferencia muy notoria con respecto al trabajo presentado por Lessa *et al.* [72], quién reportó una menor capacidad

antioxidante ($28,6 \mu\text{M TE}\bullet\text{g}^{-1}$ MS) oxido reductora (FRAP) menor en muestras de extracto de mazorca en cacao fresco.

En muestras de mucílago de cacao el proceso de fermentación puede influir directamente en la capacidad antioxidante de este residuo. Según el trabajo de Zhunio [64], la actividad antioxidante en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) procedentes de las variedades CCN-51($3,35 \mu\text{M TE}\bullet\text{g}^{-1}$) y tipo Nacional x Trinitario ($7,89 \mu\text{M TE}\bullet\text{g}^{-1}$), existe un efecto de la variedad, encontrándose una actividad antioxidante superior en mucilago de cacao del tipo Nacional x Trinitario.[64]

La importancia del estudio del contenido de antioxidantes y la actividad antioxidante de los residuos de cacao permite evidenciar identificar el potencial bioactivo que presentan subproductos como la placenta, debido a la presencia de flavonoides como las catequinas, antocianinas y las procianidinas. Estos compuestos se destacan por su baja toxicidad y elevada acción antioxidante, debido a su alta capacidad de obstruir la peroxidación lipídica, además de reducir la acción de los radicales libres y quelar metales [81]. En la Tabla 14, se presenta un estudio de correlación entre el contenido de antioxidantes y la actividad antioxidante de placenta de cacao

Tabla 14 - Coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos presentes en la placenta de cacao.

PERFIL DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	
	ABTS (%)	FRAP (%)
Antocianinas	77,13	57,71
Carotenoides	50,19	20,97
Polifenoles	-56,96	-30,59
Flavonoides	87,81	89,36

Elaborado por: Chumaña Oscar, 2022.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 14 la actividad antioxidante de la placenta de cacao evaluada mediante el método ABTS⁺ demostró una correlación positiva moderada con compuestos como: carotenoides (50,19%) y antocianinas (77,13%). Sin embargo, los flavonoides (87,81%) presenta una correlación positiva alta con la actividad antioxidante medida por este método, lo que indica que existe la presencia de componentes que funcionan como antioxidantes e inhiben la acción degenerativa de los radicales libres que se encuentra en nuestro organismo. Sin embargo, los polifenoles totales presentaron una

correlación negativa (-56,96%) con la actividad antioxidante, lo que demuestra que los componentes fenólicos no son responsables de la actividad antioxidante de la placenta de cacao [82].

En el estudio de correlación de la actividad antioxidante medida por el método FRAP, se demostró que existe una correlación positiva moderada con el contenido de antocianinas (57,71%) y un nivel bajo positivo en carotenoides (20,97%). Los flavonoides (89,36%) presentan una correlación positiva alta con la actividad antioxidante de placenta de cacao, lo que demuestra que este tipo de compuestos son los responsables de disminuir los compuestos de naturaleza metálica, que dentro de nuestro organismo actúan como prooxidantes, ayudando a estabilizar radicales libres. Mientras que en polifenoles totales (-30,59%) se evidenció una correlación negativa con la actividad antioxidante [83], [84]

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La placenta de cacao de tipo Nacional x Trinitario, presentó en compuestos bioactivos como antocianinas (8,26 mg cianidina-3-glucósido•g), carotenoides (2,07 mg β -caroteno•g), polifenoles (1066,43 mg GAE•100g) y flavonoides (1021,353 mg CE•100g). De la misma manera la placenta del clon CCN-51 es rico en antocianinas (3,71 mg cianidina-3-glucósido•g), carotenoides (1,78 mg β -caroteno•g), polifenoles (1180,50 mg GAE•100g) y flavonoides (887,618 mg CE•100g).
- La relación del contenido de antioxidantes totales y la actividad antioxidante hallada en la placenta podría estar asociado a las tonalidades rojizas en el clon CCN-51 gracias a la riqueza de polifenoles y flavonoides totales entre estos las antocianinas, sin embargo, las tonalidades verdes y amarillas que se asocian a los carotenoides totales podrían ligarse a la coloración del tipo Nacional x Trinitario.
- La actividad antioxidante de la placenta de cacao tipo Nacional x Trinitario presentó valores de 235,85 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ y 227,04 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ para ABTS⁺ y FRAP; respectivamente. Por otro lado, la actividad antioxidante de la placenta en el clon CCN-51 evidenció valores de 198,50 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ y 187,47 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ en ABTS⁺ y FRAP; en ese orden.
- Existe un efecto de la variedad de procedencia de la placenta de cacao en el contenido de carotenoides y actividad antioxidante medida por ABTS⁺ en cacao tipo Nacional x Trinitario y clon CCN-51. No obstante el contenido de antocianinas, polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante medida por FRAP, no presentaron un efecto estadísticamente significativo de acuerdo con el tipo de cacao, con un valor $t_{\text{student}}_{\text{calculado}}$ inferior al $t_{\text{crítico}}$ (0,05), en todos los casos.

5.2. Recomendaciones

- Realizar un estudio económico para determinar el valor redituable en los compuestos bioactivos que se encuentran estructurando los residuos como la placenta de cacao de las variedades localizadas en la zona ecuatoriana.
- Aplicar un sistema de biorrefinería en los subproductos resultantes de la cadena de beneficio del cacao para introducirlos a industrias alimentarias, química, farmacéutica debido a riqueza en compuestos antioxidantes.
- Aplicar un sistema paralelo de control de residuos para reducir el enorme impacto ambiental que genera el desaprovechamiento de todos estos valiosos subproductos.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Citas bibliográficas

- [1] L. Vásquez, “Inducción *Rhizobium japonicum* en la masa fermentativa de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional y Trinitario como estrategia para la disminución de cadmio.” Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2021.
- [2] A. López, “Producción y Comercialización de Cacao Fino de Aroma en el Ecuador - Año 2012-2014,” 2017.
- [3] S. Moreira, “Caracterización del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) nacional y trinitario en el cantón Quevedo,” Universidad Técnica Estatal De Quevedo, 2020.
- [4] A. Pallares, M. Estupiñán, J. Perea, and L. López, “Impact of fermentation and drying in polyphenol content and antioxidant capacity of cocoa variety CCN-51,” *Ion*, vol. 29, pp. 7–21, 2016.
- [5] C. H. A. Arrazate *et al.*, “Antioxidant activity in genotypes of *theobroma* spp. (malvaceae) in mexico,” *Rev Biol Trop*, vol. 69, no. 2, pp. 507–523, 2021, doi: 10.15517/rbt.v69i2.41626.
- [6] E. Valencia, I. I. Figueroa, E. Sosa Martínez, M. C. Bartolomé Camacho, H. E. Martínez Flores, and M. E. García Pérez, “Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas,” pp. 15–29, 2017.
- [7] O. Cartaya and I. Reynaldo, “Flavonoides : Características químicas y aplicaciones,” *Cultivos tropicales*, vol. 22, no. 2, pp. 5–14, 2001.
- [8] J. M. Peñarrieta, L. Tejeda, P. Mollinedo, J. L. Vila, and J. A. Bravo, “[Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos]. Phenolic Compounds in Food.,” *Revista Boliviana De Química*, vol. 31, pp. 68–81, 2014.
- [9] G. A. Garzón, “Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds. a review,” *Acta Biolo Colomb*, vol. 13, no. 3, pp. 27–36, 2010.

- [10] N. Delgado, “Plan de manejo integral de residuos derivados de la extracción de la pulpa de cacao en la hacienda Bellavista, Luz de América, provincia de Azuay-Ecuador,” Universidad de Cuenca, Cuenca, 2018.
- [11] E. Valencia, I. I. Figueroa, E. Sosa Martínez, M. C. Bartolomé Camacho, H. E. Martínez Flores, and M. E. García Pérez, “Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas,” pp. 15–29, 2017.
- [12] Z. J. Coronel Álvarez, ““Determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de las variedades CCN-51 y Nacional por distintos métodos,”” Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2021.
- [13] M. Lozano, “Utilización de los subproductos del beneficio del cacao: una revisión,” Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2020.
- [14] J. Aguavil, “Elaboración de galletas a partir de la harina de placenta de cacao.,” Univesidad Tecnológica Equinoccial Extensión Santo Domingo, 2012.
- [15] Anacafé, “Programa De Diversificación De Ingresos En La Empresa Cafetalera,” 2004.
- [16] C. Almachi, ““Incorporación de compuestos bioactivos de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L) y pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) para el desarrollo de un chocolate blanco con propiedades funcionales,”” Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2020.
- [17] C. Mariaca, M. Zapata, and P. Uribe, “Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias,” *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, vol. 24, no. 3, pp. 162–173, 2016, doi: 10.29176/2590843x.292.
- [18] Instituto Nacional del Cáncer, “Antioxidantes y prevención del cáncer,” 2017. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/dieta/hoja-informativa-antioxidantes>
- [19] E. V. A. G. Creus, “Compuestos fenólicos,” vol. 23, pp. 80–84, 2004.

- [20] S. Peña and J. López, “Desarrollo sostenible y oportunidad de aprendizaje de las biorrefinerías: Una alternativa de la biomasa,” *Rev Cienc Soc*, vol. XXVI, 2020, doi: 10.31876/rcs.v26i0.34135.
- [21] G. Alarcón, “Evaluación del comportamiento agro morfológico de cuatro clones de *Theobroma cacao* L. (cacao) con tres distanciamientos de siembra,” Universidad Estatal del Sur de Manabí, 2019.
- [22] P. S. Verdesoto, “Caracterización química preliminar de cacao (*Theobroma cacao*) de los municipios de Omoa y La Masica, Honduras,” *Zamorano*, p. 66, 2009.
- [23] J. V. Chang, C. V. Torres, D. P. Moran, W. M. Rodríguez, J. M. Véliz, and R. R. Remache, “Atributos físicos-químicos y sensoriales de las Almendras de quince clones de cacao nacional,” *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Pichilingue*, vol. 7, no. 2, pp. 21–34, 2014.
- [24] G. Alarcón, “Evaluación del comportamiento agro morfológico de cuatro clones de *Theobroma cacao* L. (cacao) con tres distanciamientos de siembra,” Universidad Estatal del Sur de Manabí, 2019.
- [25] P. Velastegui, “Investigación del cacao de Santo Domingo de los Tsáchilas para sus múltiples usos en la gastronomía,” 2019.
- [26] Toak Chocolate Industry, “Toak Property,” 2018. <https://toakchocolate.com/blogs/news/the-different-grades-of-ecuadorian-cacao>
- [27] J. Toth, “Toak Chocolate,” 2018. <https://toakchocolate.com/blogs/news/near-extinction-of-the-worlds-oldest-cacao-variety>
- [28] J. Jacome, “Análisis de la diversidad fenotípica de cacao nacional x trinitario *Theobroma cacao* L en la provincia de El Oro,” *Universidad Técnica de Machala-Ecuador*, p. 40, 2018.
- [29] R. Burbano, “Evaluación De Un Sistema Semiautomatizado Para La Fermentación De *Theobroma Cacao* L. (Nacional Y Súper Árbol) En La Amazonía Norte Ecuatoriana,” 2020.

- [30] C. de C. Living, “Cacao: Origen Propiedades y Beneficios,” 2020.
<https://casadecampoliving.com/es/cacao-origen-propiedades-y-beneficios/>
- [31] Gourmet de México, “¿Cuáles son los tipos de cacao?,” 2019.
<https://gourmetdemexico.com.mx/comida-y-cultura/tipos-de-cacao/>
- [32] Anecacao, “CACAO CCN 51,” 2005. <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>
- [33] Q. Fuentes, L. Fernando, and G. C. Salomón, “Perfil del Sabor del Clon CCN51 del Cacao (Theobroma cacao L .) Producido en Tres Fincas del Municipio de San Vicente de Chucurí Flavor Profile of Clone CCN 51 Cocoa (Theobroma cacao L .) Produced in Three Farms Municipality of San Vicente de Chucurí Re,” pp. 45–58, 2011.
- [34] Ecoyuma, “Plántula de Cacao CCN-51,” 2022. <https://tienda.ecoyuma.com.co/cacao-injertado-introducido/63-plantula-de-cacao-ccn-51.html>
- [35] Agrotendencia, “El cacao,” 2018. <https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-cacao/>
- [36] V. Talledo, “Evaluación del estándar de calidad en el manejo postcosecha del cacao (Theobroma cacao) en la Comuna el Bejuco del Sitio Hacha del cantón Chone en el 2019,” 2019.
- [37] V. Arce, “Extracción y caracterización de los flavonoides obtenidos de la cáscara del fruto de cacao (Theobroma cacao L.) para su valorización,” Universidad de Costa Rica, 2018.
- [38] E. Sangronis, M. J. Soto, Y. Valero, and I. Buscema, “Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones,” *Archivos Latinoamericanos de Nutrición Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, vol. Vol, 64, 2014.
- [39] K. Suarez, “Partes del Theobroma Cacao L.,” 2019.
- [40] K. Tapia García, “Evaluación del mucilago y placenta de dos variedades de cacao (Theobroma cacao L.) aplicando dos métodos conservantes en la obtención de mermelada,” pp. 1–104, 2016.

- [41] Chamaidan R., *Efecto inhibitorio del ácido cítrico en el pardeamiento de la placenta de cacao (Theobroma cacao) previo a la obtención de harina mediante deshidratado adiabático*. 2020.
- [42] J. Aguavil, “Elaboración de galletas a partir de la harina de placenta de cacao en la UTE,” Universidad Tecnológica Equinoccial, Santo Domingo, 2012.
- [43] T. Bernal, “Residuos de la Industria de Chocolatera - cascarilla,” Universidad de Cuenca, 2021.
- [44] Ecolec, “Economía circular,” 2018.
- [45] E. Matamoros, “Técnica de aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos de cosechas de cacao,” Universidad de Guayaquil, 2016.
- [46] Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura., *Tecnologías de la bioeconomía para valorizar residuos y desperdicios: oportunidades de negocio para la agricultura familiar*. 2020.
- [47] A. A. Arreaga Chévez, ““Identificación del perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) de las variedades CCN-51 y Nacional,”” no. 593, pp. 20–23, 2020.
- [48] R. Candelario and J. Suarez, ““Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante de la cáscara de veteraba (Beta vulgaris L.) trabajo’.,” Universidad de Guayaquil, 2019.
- [49] B. Winkel-shirley, “Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology1,” vol. 126, no. June, pp. 485–493, 2001.
- [50] G. del Valle-Leguizamón, A. González-León, and R. Báez-Sañudo, “Antocianinas en Uvas (Vitis vinifera L.) y su Relación con el Color,” *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 28, no. 4, p. 359, 2005, doi: 10.35196/rfm.2005.4.359.
- [51] Y. A. Harkous, “Efectos De Los Polifenoles En El Tratamiento De La Esclerosis Múltiple,” *Terapeía*, pp. 121–154, 2019.

- [52] Baleares, “El cacao natural es el único que mantiene todas sus propiedades antioxidantes,” 2019.
- [53] S. N. Hernández Guance, L. Marino, D. Isern, I. Coria, and I. M. Irurzun, “Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales,” *Invenio*, vol. año 22, no, pp. 11–27, 2019.
- [54] S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J. M. Culebras, and M. J. Tuñón, “Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes,” *Nutr Hosp*, vol. 17, no. 6, pp. 271–278, 2002.
- [55] M. Alejandro-Espinosa, X. Jaramillo-Fierro, S. Ojeda-Riascos, O. Malagón-Aviles, and J. Ramírez-Robles, “Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador,” *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat*, vol. 12, no. 1, pp. 59–68, 2013.
- [56] V. Vera de Rosso, S. Hillebrand, E. Cuevas Montilla, F. O. Bobbio, P. Winterhalter, and A. Z. Mercadante, “Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 21, no. 4, pp. 291–299, 2008, doi: 10.1016/j.jfca.2008.01.001.
- [57] A. Quintana, H. Oliva, C. Hern, and E. P. Mechetnov, “Carotenoides . ¿Qué son y para qué se usan?,” vol. 69, 2018.
- [58] M. Carranco, M. de la C. Calvo, and F. Pérez-Gil, “Carotenoides y su función antioxidante: Revisión,” vol. 61, 2011.
- [59] M. Vilaplana, “Antioxidantes presentes en los alimentos,” *Offarm*, vol. 26, no. 10, pp. 79–86, 2007.
- [60] A. Mandal, “Relación estabilizante/neutralizante de un antioxidante ante un Radical libre,” 2012.
- [61] Mapfre, “Radicales libres,” 2020. <https://www.salud.mapfre.es/nutricion/reportajes-nutricion/radicales-libres/>

- [62] A. M. Pisoschi and G. P. Negulescu, "Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review," *ResearchGate*, vol. 01, no. 01, 2012, doi: 10.4172/2161-1009.1000106.
- [63] S. Singh and R. P. Singh, "In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview," *Food Reviews International*, vol. 24, no. 4, pp. 392–415, 2008, doi: 10.1080/87559120802304269.
- [64] B. J. Zhunio Rodríguez, "Evaluación de la actividad antioxidante en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Variedades: CCN-51 y nacional," pp. 19–25, 2020, [Online]. Available: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5311/1/T-UTEQ-0093.PDF>
- [65] I. Samaniego and E. Espín, "Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao. In Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias," vol. 105, 2016.
- [66] S. Y. Leong and I. Oey, "Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables," *Food Chem*, vol. 133, no. 4, pp. 1577–1587, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.052.
- [67] I. Samaniego, E. Espín, J. Quiroz, B. C. W. Ortiz, C. García-Viguera, and P. Mena, "Efecto del área de cultivo sobre el contenido de metixantinas y flevan-3-oles en granos de cacao de Ecuador," *Revista de composición y análisis de alimentos*, vol. 88, 2020.
- [68] J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals," *Food Chem*, vol. 64, no. 4, pp. 555–559, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.
- [69] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radic Biol Med*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, May 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- [70] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay," *Anal Biochem*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, Jul. 1996, doi: 10.1006/ABIO.1996.0292.

- [71] A. Vázquez-Ovando, I. Ovando-Medina, L. Adriano-Anaya, D. Betancur-Ancona, and M. Salvador-Figueroa, “Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma,” 2016.
- [72] O. A. Lessa *et al.*, “Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids,” *Food Sci Biotechnol*, vol. 27, no. 1, pp. 107–113, 2018, doi: 10.1007/s10068-017-0196-x.
- [73] O. Nazario, E. Ordoñez, Y. Mandujano, and J. Arévalo, “Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y analisis sensorial del licor de cacao (Theobroma Cacao L.) Criollo y siete clones,” vol. 3, no. 1, pp. 51–59, 2014.
- [74] A. Brenes-Soto, “Los Carotenoides dietéticos en el organismo animal,” San José, 2014.
- [75] S. M. P. Hernández, J. J. Estévez, L. J. L. Giraldo, and C. J. M. Méndez, “Supercritical extraction of bioactive compounds from cocoa husk: Study of the main parameters,” *Revista Facultad de Ingenieria*, no. 91, pp. 95–105, 2019, doi: 10.17533/udea.redin.n91a09.
- [76] S. Murillo-Baca, F. Ponce-Rosas, and M. Huamán-Murillo, “Physicochemical characteristics, bioactive compounds and minerals content in cocoa fruit (Theobroma cacao L.) shell flour,” *Manglar*, vol. 17, no. 1, pp. 67–73, Jun. 2020, doi: 10.17268/manglar.2020.011.
- [77] Cadena F. F., “Diseño del proceso para la elaboración de una bebida energética a partir de excedentes de cacao,” *Tesis de pregrado*, p. 106, 2015.
- [78] Goude K.F, Adingra K.M.D, Gbotognon O.J, and Kouadio E.J.F, “Biochemical characterization, nutritional and antioxidant potentials of cocoa placenta (Theobroma Cacao L.),” *Annals. Food Science and Technology*, vol. 20, no. 3, pp. 603–613, 2019, [Online]. Available: www.afst.valahia.ro
- [79] E. N. Da Silva, D. Da Cruz Ramos, L. Miranda Menezes, A. O. De Souza, S. C. Da Silva Lannes, and M. V. Da Silva, “Nutritional value and antioxidant capacity of ‘cocoa honey’

- (*Theobroma cacao* L.),” *Food Science and Technology (Brazil)*, vol. 34, no. 4, pp. 755–759, 2015, doi: 10.1590/1678-457X.6447.
- [80] U. Peñaranda, “Influencia del Secado por Atomización de Mucílago de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Contenido de Polifenoles y Capacidad Antioxidante,” 2019. [Online]. Available: https://repositorio.concytec.gob.pe/bitstream/20.500.12390/187/3/2017_Puicon_Evaluacion-resistencia-natural.pdf
- [81] E. Ordoñez, A. Arevalo, and H. Rojas, “Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis Vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*),” *Scientia Agropecuaria*, vol. 10, p. 2, 2019.
- [82] J. Pérez-Jiménez *et al.*, “Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors,” *Nutrition*, vol. 24, no. 7–8, pp. 646–653, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.nut.2008.03.012.
- [83] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, “Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, May 18, 2005. doi: 10.1021/jf0502698.
- [84] E. V. Carpio, L. M. Castro, and M. Campo Fernández, “Caracterización físico-química de la cascarilla de *Theobroma cacao* L, variedades Nacional y CCN-51 Physical-chemical characterization of *Theobroma cocoa* L husk, National varieties and CCN-51.” [Online]. Available: <http://investigacion.utmachala.edu.ec/proceedings/index.php/utmach/index>

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 1. Evidencia fotográfica del proceso postcosecha



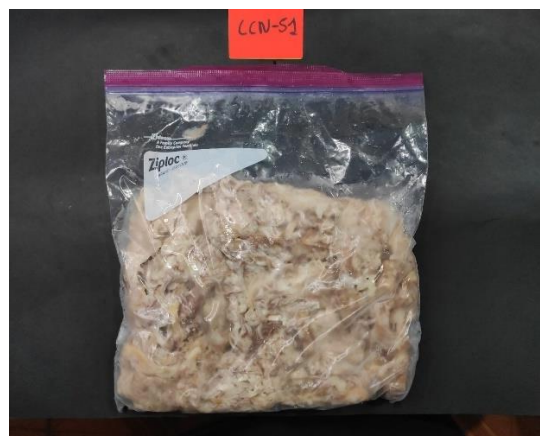
Recepción de mazorcas de las dos variedades estudiadas



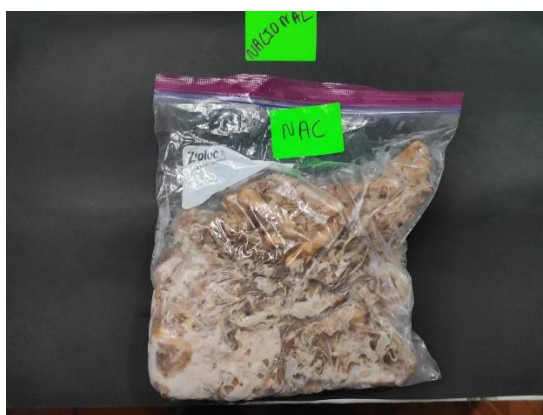
Separación y recolección de placenta.



Muestras de placenta de dos variedades
Clon CCN-51 y complejo
NacionalxTrinitario.

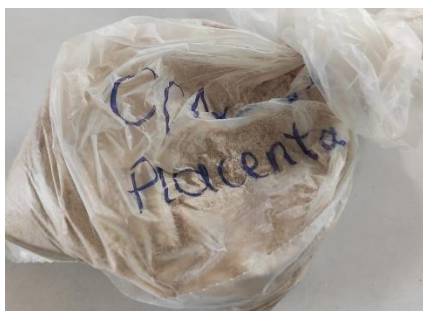


Muestras congeladas de placenta CCN-51.

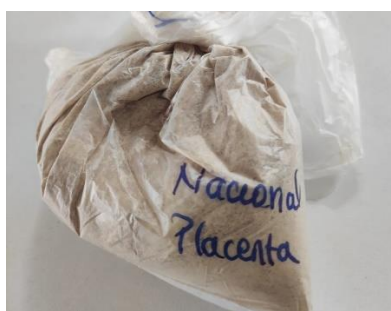


Muestras congeladas de placenta Nacional.

Anexo 2. Evidencia fotográfica de la fase de extracción de compuestos bioactivos



Muestra liofilizada CCN-51



Muestra liofilizada Nacional



Pesado de muestras



Muestras en tubos



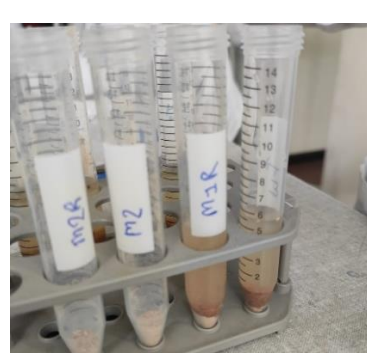
Muestras en Vortex



Baño de ultrasonido



Centrifugación de muestras

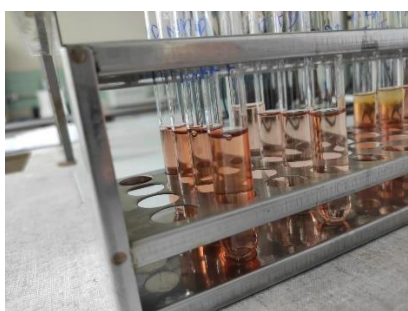


Separación de fases sólido-acuosa



Baño María

Anexo 3. Medición de absorbancias



Compuestos extraídos



Celdas del espectrofotómetro



Espectrofotómetro