



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

Unidad de Integración
Curricular para la obtención
del Título de Ingeniera en
Alimentos.

Título de la Unidad de Integración Curricular:

“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES
TOTALES EN CASCARILLA DE DOS VARIEDADES DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.): NACIONAL Y CCN-51”

Autora:

Melissa Leonor Loor Intriago

Directora:

Ing. Wilma Maribel Llerena Silva M. Sc.

Co-Director

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

Mocache-Los Ríos-Ecuador

2020



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Loor Intriago Melissa Leonor, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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

Loor Intriago Melissa Leonor

C.I. 0929490282



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, M- Sc. Docente de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

CERTIFICA que la estudiante Llor Intriago Melissa Leonor, realizó de la Unidad de Integración Curricular titulada “CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN CASCARILLA DE DOS VARIEDADES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.): NACIONAL Y CCN-51”, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

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

Dr. Iván Samaniego Maigua M. Sc. (INIAP)
CO-DIRECTOR



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

Dado cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, la suscrita Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, M. Sc. en calidad de Directora de la Unidad de Integración Curricular titulada “CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN CASCARILLA DE DOS VARIEDADES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.): NACIONAL Y CCN-51” de autoría del estudiante Loor Intriago Melissa Leonor certifica 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.

URKUND

Document Information

Analyzed document	TFG_Melissa Loor_16- NOV-2020_.docx (D86385949)
Submitted	11/23/2020 9:01:00 PM
Submitted by	
Submitter email	melissa.loor2015@uteq.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	wllerenas.uteq@analysis.arkund.com

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

Dr. Iván Samaniego Maigua M. Sc. (INIAP)
CO-DIRECTOR



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Título

**“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES
TOTALES EN CASCARILLA DE DOS VARIEDADES DE CACAO
(*Theobroma cacao* L.): NACIONAL Y CCN-51”**

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

Aprobado por:

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

MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Ing. Rossy Rodríguez Castro, M. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL
Ing. Ángel Fernández Escobar, M. Sc.

Mocache- Los Ríos- Ecuador

2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por mostrarme el camino correcto en la búsqueda de nuevos logros personales y profesionales. A las autoridades y docentes por todos los conocimientos impartidos durante mi preparación universitaria.

A la universidad Técnica Estatal de Quevedo por permitirme formar parte de ella. A la Asociación La Cruz y la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP), especial al Departamento de Nutrición y Calidad quienes permitieron llevar a cabo la presente investigación.

A mi Directora de Tesis, M. Sc. Wilma Llerena Silva, a quien agradezco infinitamente por saberme guiar para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Dedicó el presente proyecto de investigación a Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este período.

A mi familia por darme la estabilidad económica y emocional para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes. En especial a mis padres y a mis hermanos, quienes han sido el pilar fundamental de mi vida y un gran ejemplo de perseverancia a lo largo de mi carrera universitaria, por enseñarme que todo esfuerzo al final tiene su recompensa.

RESUMEN EJECUTIVO

En la cadena de beneficio del cacao (*Theobroma cacao* L.), el 10 % del fruto del cacao es aprovechado por la industria chocolatera y el 90% de los componentes (mazorca, cascarilla, mucilago) son depositados en el suelo, causando pérdidas y contaminación al medio ambiente. La cascarilla de cacao es un residuo que podría presentar un elevado contenido en compuestos fenólicos, con un excelente potencial para su utilización como fuente importante de antioxidantes de origen natural de bajo costo. Por esta razón el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales en cascarilla de cacao de dos variedades Nacional y CCN-51. Las determinaciones analíticas del contenido fenólico se realizaron por espectrofotometría UV-VIS y el contenido de vitamina C se evaluó, mediante cromatografía HPLC, empleando una columna de exclusión iónica. De acuerdo a los resultados obtenidos, presentando mayor contenido en la variedad CCN-51 (PT: 42.17 mg AGE•100g⁻¹ y FT: 20.57 mg CAT•100g⁻¹).en comparación a la nacional (PT: 29.43 mg AGE•100g⁻¹ y FT: 15.08 mg CAT•100g⁻¹); sin embargo, no se identificó presencia de vitamina C, en las dos variedades estudiadas. A través de un análisis de correlación de Pearson, se estableció que existe una correlación positiva fuerte ($0,8 > r < 1$) entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante (CA) medida por los métodos de ABTS (0,9962); FRAP (0,8484) y ORAC (0,8484). El contenido de flavonoides totales presentó una correlación positiva moderada ($0,5 > r < 0,8$) con la CA medida por FRAP (0.7944) y ORAC (0.7944) y fuerte ($0,8 > r < 1$); mientras que, la CA medida ABTS presentó una correlación positiva fuerte ($0,8 > r < 1$) con el contenido de flavonoides. Por lo tanto, la valorización de residuos de la cadena de beneficio del cacao puede dar lugar a un producto económico, con una fuente potencial de fitonutrientes cuyas funciones biológicas son: inhibir compuestos metálicos prooxidantes, atrapar radicales libres (RL) y radicales peróxido, cuyas especies reactivas del oxígeno (ROS) son responsables del daño de proteínas, ADN, ARN, en nuestro organismo.

Palabras claves: antioxidantes totales, capacidad antioxidante, contenido de flavonoides, contenido de polifenoles, subproductos, valorización de residuos.

ABSTRACT

In the cocoa benefit chain (*Theobroma cacao* L.), 10% of the cocoa fruit is used by the chocolate industry and 90% of the components (cob, husk, mucilage) are deposited on the ground, causing losses and pollution to the environment. Cocoa husk is a residue that could have a high content of phenolic compounds, with excellent potential for use as an important source of low-cost natural antioxidants. For this reason, the objective of this research work was to evaluate the content of vitamin C, polyphenols and total flavonoids in cocoa husks of two varieties Nacional and CCN-51. The analytical determinations of the phenolic content were made by UV-VIS spectrophotometry and the vitamin C content was evaluated by HPLC chromatography, using an ion exclusion column. According to the results obtained, the national variety cocoa husk presented the lowest content of total polyphenols (29.437 mg AGE•100g⁻¹) and total flavonoids (15.08 g EC • 100g⁻¹); in comparison with CCN- 51 cocoa (PT: 42.17 mg AGE•100g⁻¹ y FT: 20.57 mg CAT•100g⁻¹). However, the presence of vitamin C was not identified in the two varieties studied. Through a Pearson correlation analysis, it was established that there is a strong positive correlation ($0.8 > r < 1$) between polyphenol content and antioxidant capacity (CA) measured by ABTS methods (0.9962) ; FRAP (0.8484) and ORAC (0.8484). The total flavonoid content presented a moderate positive correlation ($0.5 > r < 0.8$) with the AC measured by FRAP (0.7944) and ORAC (0.7944). y strong ($0.8 > r < 1$); while, the ABTS measured CA presented a strong positive correlation ($0.8 > r < 1$) with the flavonoid content. Therefore, the recovery of residues from the cocoa profit chain can give rise to an economical product, with a potential source of phytonutrients whose biological functions are: inhibiting pro-oxidant metal compounds, trapping | free radicals (RL) and peroxide radicals, whose reactive oxygen species (ROS) are responsible for the damage of proteins, DNA, RNA, in our body.

Keywords: total antioxidants, antioxidant capacity, flavonoid content, polyphenol content, by-products, waste recovery.

Tabla de contenido

Contenido	Página
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.....	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivo general.	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6
1.3. Justificación.....	6
CAPÍTULO II.....	8
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.1. Marco conceptual.	9
2.1.1. Cacao.	9
2.1.2. Cascarilla.	9
2.1.3. Polifenoles.	9
2.1.4. Flavonoides.....	9
2.2. Marco teórico.....	10
2.2.1. Producción de cacao en Ecuador.....	10
2.2.2. Procesamiento del cacao en la industria.	11
2.2.3. Variedades de cacao.	12
2.2.3.1. Nacional Fino de Aroma.....	14
2.2.3.2. CCN-51.....	14
2.2.3.3. Criollo.....	15
2.2.3.4. Forastero Amazónico.....	16

2.2.3.5.	Trinitario.....	16
2.2.4.	Proceso postcosecha.	16
2.2.5.	Cascarilla de cacao.	17
2.2.6.	Polifenoles.	18
2.2.7.	Capacidad antioxidante.....	19
2.2.7.1.	Antioxidantes enzimáticos.....	19
2.2.7.2.	Antioxidantes no enzimáticos.....	19
2.3.	Marco referencial.....	20
2.3.1.	Investigaciones previas.....	20
CAPÍTULO III		22
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		22
3.1.	Localización.....	23
3.2.	Tipos de investigación.....	23
3.2.1.	Investigación descriptiva.	24
3.2.2.	Investigación exploratoria.	24
3.2.3.	Investigación experimental.....	24
3.3.	Métodos de la investigación.	24
3.3.1.	Método inductivo-deductivo.....	24
3.3.2.	Método experimental.....	24
3.4.	Fuentes de recopilación de información.....	25
3.5.	Diseño de la investigación.....	25
3.5.1.	Esquema del análisis de varianza.	26
3.5.2.	Análisis de correlación.	26
3.6.	Procedimiento experimental.	27
3.6.1.	Muestreo.	27
3.6.2.	Fermentación y secado del cacao	27
3.6.3.	Preparación de las muestras.....	28
3.7.	Contenido de antioxidantes totales.....	28
3.7.1.1.	Extracción de Vitamina C.....	29
3.7.2.	Determinación de antioxidantes totales.....	29
3.7.3.1.	Polifenoles totales.....	31

3.7.3.2.	Flavonoides totales.....	31
3.7.3.3.	Vitamina C.....	31
3.8.	Recursos humanos y materiales.....	32
3.8.1.	Recursos humanos.....	32
3.8.3.	Materiales de laboratorio.....	32
3.8.4.	Reactivos.....	32
3.8.5.	Equipos.....	33
CAPITULO IV		34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		34
4.1.	Índice de rendimiento.....	35
4.2.	Validación de los métodos.....	36
4.2.1.	Linealidad.....	36
4.2.2.	Límites de detección y cuantificación.....	38
4.2.3.	Exactitud.....	39
4.2.4.	Precisión.....	40
4.2.5.	Polifenoles totales.....	41
4.2.6.	Flavonoides totales.....	42
4.2.7.	Vitamina C.....	43
CAPÍTULO V.....		47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		47
5.1.	Conclusiones.....	48
5.2.	Recomendaciones.....	49
CAPÍTULO VI		50
BIBLIOGRAFÍA		50
6.1.	Bibliografía consultada.....	51

Índice de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Superficie cosechada (has) por provincia 2013-2016.....	11
Tabla 2. Requisitos técnicos del cacao CCN-51.....	15
Tabla 3. Composición proximal de la cascarilla de cacao.....	18
Tabla 4. Localización de la investigación.....	23
Tabla 5. Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (Nacional y CCN-51) en el contenido de polifenoles y flavonoides totales y vitamina C en la cascarilla de cacao.....	26
Tabla 6. Matriz de correlación para relacionar el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) y vitamina C de cascarilla de cacao con la actividad antioxidante.	27
Tabla 7. Índice de rendimiento de las variedades de cacao Nacional y CCN-511 final del proceso de descascarillado.....	36
Tabla 8. Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración en Polifenoles y Flavonoides totales	36
Tabla 9. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del contenido de Polifenoles y Flavonoides totales	38
Tabla 10. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) de cascarilla de cacao con la actividad antioxidante por ABTS, FRAP Y ORAC	45

Índice de figuras

Figura	Página
Figura 1. Variedades de cacao.....	13
Figura 2. Mecanismo de actividad de antioxidantes de los polifenoles	18
Figura 3. Trompeta de Horwitz	30
Figura 4. Porcentaje de residuos del cacao	35
Figura 5. Curvas de calibración promedio para la determinación de polifenoles y flavonoides totales por concentración de ácido gálico (A) y catequinas (B).	37
Figura 6. Recuperación de los componentes bioactivos responsables de la capacidad antioxidante en polifenoles (A) y flavonoides totales (B) en muestras de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 en función de los ciclos de extracción.....	39
Figura 7. Resultados del estudio de precisión de los métodos para la determinación de capacidad antioxidante de polifenoles (A) y flavonoides totales (B) en muestra de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 en función de los ciclos de extracción.....	40
Figura 8. Contenido de polifenoles totales en muestra de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 expresado en $\text{mg AGE}\cdot 100\text{g}^{-1}$	41
Figura 9. Contenido de flavonoides totales en muestras de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 expresado en $\text{mg CAT}\cdot 100\text{g}^{-1}$	42
Figura 10. Cromatograma de análisis de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos en cascarilla de cacao CCN-51 (A) y Nacional (B), por cromatografía HPLC.	43

Índice de anexos

Anexo	Página
Anexo 1 Evidencias fotográficas del proceso	60
Anexo 2 Datos obtenidos para el cálculo del índice de rendimiento de cascarilla de cacao Nacional y CNN-51.	63
Anexo 3 Árbol de problemas de la investigación	64

CÓDIGO DUBLIN

Título:	“CONTENIDO DE VITAMINA C, POLIFENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN CASCARILLA DE DOS VARIEDADES DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.): NACIONAL Y CCN-51”
Autor:	Melissa Leonor Loor Intriago
Palabras clave:	Antioxidantes totales, capacidad antioxidante, contenido de flavonoides, contenido de polifenoles, subproductos, valorización de residuos.
Fecha de publicación:	
Editorial:	QUEVEDO. UTEQ, 2020
Resumen:	<p>En la cadena de beneficio del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), el 10 % del fruto del cacao es aprovechado por la industria chocolatera y el 90% de los componentes (mazorca, cascarilla, mucilago) son depositados en el suelo, causando pérdidas y contaminación al medio ambiente. La cascarilla de cacao es un residuo que podría presentar un elevado contenido en compuestos fenólicos, con un excelente potencial para su utilización como fuente importante de antioxidantes de origen natural de bajo costo. Por esta razón el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales en cascarilla de cacao de dos variedades Nacional y CCN-51. Las determinaciones analíticas del contenido fenólico se realizaron por espectrofotometría UV-VIS y el contenido de vitamina C se evaluó, mediante cromatografía HPLC, empleando una columna de exclusión iónica. De acuerdo a los resultados obtenidos, presentando mayor contenido en la variedad CCN-51 (PT: 42.17 mg AGE•100g-1 y FT: 20.57 mg CAT•100g-1).en comparación a la nacional (PT: 29.43 mg AGE•100g-1 y FT: 15.08 mg CAT•100g-1); sin embargo, no se identificó presencia de vitamina C, en las dos variedades estudiadas. A través de un análisis de correlación de Pearson, se estableció que existe una correlación positiva fuerte ($0,8 > r < 1$) entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante (CA) medida por los métodos de ABTS (0,9962); FRAP (0,8484) y ORAC (0,8484). El contenido de flavonoides totales presentó una correlación positiva moderada ($0,5 > r < 0.8$) con la CA medida por FRAP (0.7944) y ORAC (0.7944) y fuerte ($0,8 > r < 1$); mientras que, la CA medida ABTS presentó una correlación positiva fuerte ($0,8 > r < 1$) con el contenido de flavonoides. Por lo tanto, la valorización de residuos de la cadena de beneficio del cacao puede dar lugar a un producto económico, con una fuente potencial de fitonutrientes cuyas funciones biológicas son: inhibir compuestos metálicos prooxidantes, atrapar radicales libres (RL) y radicales peróxido, cuyas especies reactivas del oxígeno (ROS) son responsables del daño de proteínas, ADN, ARN, en nuestro organismo.</p>
Descripción:	80 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
URL:	(en blanco hasta cuando se dispongan los repositorios)

Introducción.

La presente investigación se llevó a cabo para evaluar el contenido de vitamina C, polifenoles, flavonoides totales en cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) de dos variedades Nacional y CCN-51, permitiendo cuantificar cada uno de estos componentes antioxidantes presentes en la cascarilla.

El cacao es un cultivo propio de las zonas tropicales de Ecuador, donde el 84% de la producción se encuentra mayormente en la región Costa, mientras que, en la región Sierra y Oriente el área de cultivo corresponde al 8% cada una. A nivel mundial, el país es uno de los principales productores de cacao, aportando con las dos terceras partes de la producción mundial [1]. Las principales variedades de cacao cultivadas son el híbrido de la Colección Castro Naranjal (CCN-51) y el Cacao Arriba o Nacional, este último se considera un tipo de almendra única en el mundo [2].

La importancia de esta investigación radica en que debido a sus propiedades, el cacao es utilizado ampliamente en la industria, pero del fruto de la planta de cacao solo se utiliza la semilla sin cáscara, produciéndose diversos residuos sólidos [3]. En la industria chocolatera es limitado el uso de tecnología, por lo que apenas un 15% de las empresas o productores le dan nuevas técnicas de uso a los residuos orgánicos [4] [5]; produciendo aproximadamente 1645146 toneladas de desechos entre cáscara (90%), cascarilla (6%) y mucilago (4%), que se caracteriza por su bajo costo y elevada disponibilidad. Este aspecto toma interés en el sector alimentario, buscando el aprovechamiento de estos subproductos [6].

Han surgido nuevas propuestas sobre otras formas de uso de cascarilla de cacao; destacándose el uso en la formulación de dietas experimentales para la alimentación de pequeños mamíferos [1]. Además tienen un potencial energético para su aplicación como combustible en la alimentación de calderas, como fuente de energía [3]; sin embargo; en las aplicaciones antes mencionadas no se ha tomado en cuenta el poder extraer los diferentes componentes presentes en la cascarilla, los cuales tienen capacidad antioxidante. Esta última aplicación permite incrementar su valor comercial, además de darle una aplicación extra en la salud humana [7].

En el capítulo I, Contextualización de la investigación, se estableció el planteamiento del problema en estudio, identificando sus factores estructurales, intermedios e inmediatos. Además de identificar las variables con sus indicadores y los objetivos del problema.

En el capítulo II, Fundamentación teórica de la investigación, se indicó el marco teórico, marco conceptual y marco referencial de las variables e indicadores del problema y de igual forma se interpretan las citas de los especialistas en los temas desarrollados en este trabajo.

En el capítulo III, Metodología de la investigación, se estructuró la metodología adecuada que se aplicó en la ejecución de este estudio, definiendo el diseño experimental, y los procedimientos experimentales para los análisis realizados.

En el capítulo IV, Resultados y discusiones, detalla los resultados obtenidos en base a los objetivos planteados; difiriendo con los autores citados bibliográficamente.

En el capítulo V, Conclusiones y recomendaciones, se realizaron las conclusiones de la investigación, las mismas que son el resultado de los análisis realizados a lo largo del proceso efectuado, así como las recomendaciones sugeridas en base al enfoque de este trabajo.

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

Ecuador es uno de los principales productores cacaoteros de América y el mundo, con una producción estimada de 290 mil toneladas durante el año 2017. Debido a la gran cantidad de almendras producidas esta industria genera una gran cantidad de residuos correspondientes a la parte no comestible del fruto (mazorca, cascarilla y mucilago). Aproximadamente, entre el 45 y 50% del peso total de la mazorca corresponde a desechos que hoy en día presentan una limitada valorización.

Según unos pocos estudios, residuos como la cascarilla podrían presentar un elevado contenido en compuestos fenólicos, que podrían ser utilizados como una fuente importante de antioxidantes de origen natural y de bajo costo.

1.1.1.1. Diagnóstico.

Actualmente en el Ecuador existe una limitada valorización de residuos de la industria cacaotera, por lo que, diariamente se pierde gran cantidad de compuestos bioactivos como: vitamina C, polifenoles y flavonoides totales (Anexo 3).

La principal causa para la incipiente utilización de estos residuos, se debe a que existe una deficiente cantidad de estudios en cuanto a la composición fitoquímica de cascarilla de cacao; dando lugar a su incorrecto manejo. Esto provoca contaminación ambiental y aparición de plagas que afectan a los cultivos donde se descarga los desechos; incluyendo la *Phytophthora* spp., que afecta a la plantación de cacao.

Así también, el escaso aprovechamiento y deficiencia en la optimización de la industria cacaotera se debe al bajo costo comercial de la cascarilla, por lo que, no es rentable su aprovechamiento industrial.

Sin embargo, la cascarilla de cacao puede presentar propiedades nutritivas en especial una importante capacidad antioxidante. Por su alto contenido de fibra, su incorporación en productos alimenticios sería relevante en la salud humana ayudando a evitar desórdenes alimenticios o gastrointestinales; además de la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas.

1.1.1.2. Pronóstico.

Ecuador es un país cacaotero por tradición y su gran volumen de producción está generando un gran problema ambiental; debido al alto porcentaje de residuos generados como: cáscaras, mucílago, cascarilla y placenta. Estos residuos actualmente se encuentran infrautilizados; por lo que, el desaprovechamiento de desechos como la cascarilla de cacao provoca daño ecológico al convertirse en un foco de insalubridad.

Al no presentar alternativas de investigación que permitan realizar un aprovechamiento integral de la cascarilla de cacao, estos continuarán contribuyendo a la aparición de plagas como roedores e insectos. Además, del desarrollo de enfermedades que afectan a la plantación de cacao. Por otro lado, se estaría desaprovechando la oportunidad de darle valor agregado a este residuo repercutiendo directamente en la economía del productor.

1.1.2. Formulación del problema.

¿El desconocimiento contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales presentes en la cascarilla de cacao Nacional y CCN-51, es uno de los factores que influyen en la limitada valorización de residuos de la industria cacaotera?

1.1.3. Sistematización del problema.

- ¿Se puede valorizar los residuos de la industria chocolatera?
- ¿La cascarilla de cacao de cacao puede ser una fuente de polifenoles y flavonoides totales?
- ¿Existe un efecto de la variedad de cacao sobre el contenido de antioxidantes presentes en la cascarilla?
- ¿El uso industrial de los residuos del sector chocolatero disminuye el impacto ambiental?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

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

1.2.2. Objetivos específicos.

- Cuantificar los porcentajes de residuos generados en las etapas de recolección, fermentación, tostado y descascarillado de cacao Nacional, CCN-51.
- Evaluar el efecto de la variedad de cacao en el contenido de antioxidantes de la cascarilla de cacao.
- Demostrar la correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de los componentes bioactivos de la cascarilla de cacao.
- Establecer las condiciones más adecuadas para la extracción de compuestos antioxidantes de la cascarilla de cacao para aplicaciones industriales.

1.3. Justificación.

Según diversos estudios, la cadena de beneficio del cacao produce cerca de dos millones de toneladas de desechos entre cáscara (90%), cascarilla (6%) y mucilago (4%). Sin embargo, existen muy pocas investigaciones que planteen el aprovechamiento integral de estos residuos [8] [9]. La principal característica de los materiales de desechos obtenidos en la industrialización en las almendras de cacao es su bajo costo y elevada disponibilidad. Por lo que, este aspecto toma interés para el desarrollo de este trabajo de investigación y el sector agroalimentario.

Además de la valorización de estos residuos, este estudio busca dar solución a otras problemáticas paralelas como la contaminación ambiental y los bajos ingresos de los agricultores; mediante la optimización y aprovechamiento integral de todos los componentes del fruto del cacao. Los trabajos de investigación básica que se han desarrollado, se enfocan en el uso de cascarilla como un componente en la elaboración de piensos para la alimentación de animales en granjas avícolas y fertilizantes de plantas (abono) [8] [9].

La extracción de antioxidantes es una de las tendencias de investigación en estos últimos años; debido a que estas sustancias químicas contenidas en las partes comestibles y no comestibles de frutas y vegetales retardan y disminuyen los efectos de los radicales libres, en la oxidación celular. Esto disminuye el envejecimiento y la prevalencia de diferentes enfermedades crónico degenerativas [10] [11].

Bajo estos parámetros, se pretende aprovechar la cascarilla de cacao y convertirla en un subproducto con un alto valor agregado; donde se pretende obtener extractos y fragmentos polifenólicos que pueden ser empleados como suplementos dietéticos de alimentos con pobres propiedades antioxidantes.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

2.1.1. Cacao.

El cacao es el nombre del árbol del cacaotero (*Theobroma* en griego significa "alimento de los dioses"); originario de América tropical de la zona del alto Amazonas, su historia se remonta al tercer milenio antes de Cristo hace más de 2000 años. Civilizaciones del sur de México y América central como los Olmecas, Mayas y Aztecas fueron los primeros pueblos en reconocer y utilizar las valiosas cualidades de la almendra de cacao adaptándola a su alimentación diaria [12].

2.1.2. Cascarilla.

La cáscara o cascarilla corresponde a la parte externa del grano de cacao limpio y en buen estado. Para su excelente conservación se almacena en lugares frescos, secos y ventilados; que no esté expuesto al sol. Por lo tanto, la vida útil de la cascarilla dependerá de las condiciones de almacenamiento. Si, se lo realiza adecuadamente la cascarilla puede conservarse hasta tres años sin ningún deterioro [13].

2.1.3. Polifenoles.

Los polifenoles son compuestos que provienen del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran naturalmente en los alimentos y bebidas de origen vegetal. Estos compuestos se relacionan con ciertas características que tienen los alimentos como olor, sabor y palatabilidad [14].

2.1.4. Flavonoides.

Los flavonoides son el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, su estructura química común es un difenilpropano (C6-C3-C6). En la actualidad, ya se han identificado más de 4000 compuestos diferentes y consta de dos anillos aromáticos (A y B) [15].

2.2. Marco teórico.

2.2.1. Producción de cacao en Ecuador.

El fruto del cacao es una baya denominada mazorca, pesa aproximadamente 450 g cuando madura (de 15 a 30 cm de largo por 7 a 12 cm de ancho). Presenta una corteza rugosa de casi 4 cm de espesor. Está rellena de una pulpa rosada viscosa, dulce y comestible, que encierra de 30 a 50 granos largos (blancos y carnosos) acomodados en filas en el enrejado que forma esa pulpa. Los granos o habas del cacao tienen forma de judías: dos partes y un germen rodeados de una envoltura rica en taninos [16]. El endocarpio es duro, carnoso y leñoso en estado seco. Las semillas son café-rojizas, ovaladas, ligeramente comprimidas y miden de 20 a 50mm de largo, 12 a 16 mm de ancho y entre 7 a 12 mm de grosor [17].

En Ecuador la mayor parte de la producción de cacao se realiza en plantaciones de pequeños y medianos productores [18]. Los pequeños productores cubren aproximadamente el 70% del mercado, seguido por los medianos (20%) y grandes productores (10%). El país, es uno de los principales productores de granos de cacao, ocupando el tercer lugar a nivel mundial, con el 7% de la producción total. El continente africano lidera la producción mundial de cacao con el 73.3%, seguido por países del continente americano (16.7%), Asia y Oceanía (19%) [19].

Las dos variedades de cacao que se producen en Ecuador son Nacional Arriba (fino) y CCN-51 (corriente), principalmente en las provincias de la Costa por la naturaleza tropical del cultivo [18]. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), el sector cacaotero contribuye con el 5% de la población económicamente activa (PEA) a nivel nacional y el 15% de la PEA rural, constituyendo una base fundamental de la economía familiar de las zonas tropicales del país, ubicadas en las estribaciones de las montañas de los Andes y la Amazonía ecuatoriana [19].

Por otro lado, de acuerdo a la Corporación Financiera Nacional (CFN), hasta el año 2016, la superficie cosechada total de cacao fue de 454257 has [20], tal como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Superficie cosechada (has) por provincia 2013-2016

Año	Guayas	Manabí	Los Ríos	Otros	Total
2013	89 158	75 746	73 614	118 578	402 434
2014	52 067	81 070	80 050	118 507	372 637
2015	78 651	85 396	88 199	123 402	432 094
2016	89 607	94 904	96 200	111 722	454 257

Elaborado por: Corporación Financiera Nacional [20]

El país se encuentra entre los principales productores de granos de cacao; ocupando el tercer lugar, con un 7% de la producción total, llegando a países como Italia, Holanda, Canadá, Estados Unidos y Alemania. [18].

La exportación de cacao ha sido una actividad económica de significativa tradición e importancia para diversas zonas de la costa ecuatoriana, con el tercer lugar de las exportaciones no petroleras. Aunque en la actualidad, la magnitud de exportación es menor a la que tuvo a inicios del siglo pasado, continúa representando un cultivo destacado en la producción agrícola del país, con mayor representación en siete provincias [8].

La importancia de este cultivo se debe a que en el país se produce un cacao de alta calidad, considerado único en el mundo, por sus características organolépticas. Sin embargo, la producción ha decaído por el mal manejo postcosecha; además de los bajos precios y la baja del petróleo [20].

2.2.2. Procesamiento del cacao en la industria.

En la industria alimentaria, el procesamiento de las semillas de cacao consta de varias etapas. En el campo, el productor se encarga de cultivar el fruto y de su limpieza, luego se rompe la cáscara y el mucílago es extraído para la obtención de las almendras [21]. Una vez extraído el grano de cacao, este puede sufrir una etapa de fermentación, donde se producen distintos químicos que le dan un sabor y olor característicos, esenciales para subproductos como el chocolate. Seguidamente, los granos se llevan al secado donde son expuestos al sol (si el clima lo permite) o en máquinas de secado, para reducir la humedad del grano (6 - 8%).

Finalmente, las semillas son transportadas a la industria en sacos de aproximadamente 60 kg vigilando constantemente la humedad del lugar de almacenamiento [22]. En la etapa de limpieza del grano de cacao se combinan diferentes métodos para la remoción de todos los contaminantes: succión para extraer tierra y rocas livianas, imanes para retirar metales y vibración para eliminar rocas pesadas [23]. Posterior a la limpieza se realiza el tratamiento del grano existiendo variación dependiendo principalmente de la utilidad o los requisitos específicos que se requieran en el producto final. Estas variaciones se refieren al orden en que son ejecutadas las operaciones de producción [22].

Para el descascarillado de la semilla, esta debe someterse a algún proceso térmico (tostado). De esta manera, la humedad que pierde el grano ejerce una presión en la cascarilla, separándola del mismo. Luego, por vibración, esta cascarilla es desviada de la línea principal de producción quedando como un producto de desecho [23].

2.2.3. Variedades de cacao.

En el mercado mundial de cacao se distingue dos amplias categorías provenientes de almendras de la variedad “fino o de aroma” y el “corriente u ordinario”; agrupándolas en cuatro variedades principales: Criollo, Forastero Amazónico, Trinitario y Nacional o Fino de Aroma. El cacao fino o de aroma proviene de las variedades de tipo Criollo y Trinitario, mientras que, el cacao ordinario proviene de las variedades de tipo Forastero. Ecuador es el país líder mundial en la producción de cacao, presentando el mayor porcentaje de producción en la región Costa en provincias como Guayas, Manabí, Los Ríos y El Oro. Además, es el mayor exportador (61%) de la variedad Nacional o Fino de Aroma [24]. En la Figura 1 se indican las variedades de cacao.

VARIETADES DE CACAO

Nacional Fino de aroma.



CCN-51



Criollo



Forastero Amazónico



Trinitario



Figura 1. Variedades de cacao

2.2.3.1. Nacional Fino de Aroma.

El cacao Nacional Fino de Aroma o sabor Arriba es una variedad de cacao de excelente calidad, considerado único en el mundo; debido a sus características aromáticas muy perceptivas y particulares. El sabor “arriba” del cacao Nacional es muy particular y diferente, por lo que, se lo describe como sabor floral fuerte, con matices de astringencia, sabor a leguminosas verdes, flores de cítricos; dejando una sensación de frescura que invade la boca y desaparece rápidamente [25].

En Ecuador predominan las explotaciones de menos de 50 Ha (47%). Se estima que 90% de la producción de cacao fino Nacional se realiza en sistemas tradicionales y semitecnificados, mientras que la mayoría de la variedad CCN-51 se efectúa en sistemas tecnificados. Existen diferencias importantes entre los dos tipos de cacao producidos en el país, especialmente que la variedad CCN-51 registra una mayor productividad, así como un inicio más temprano de producción y mayor resistencia a ciertas enfermedades [18].

En 2012, el cacao fue el quinto producto más exportado de productos no oleaginosos, siendo superado por banano, pescado, rosas y otras formas de oro para uso no monetario, se registró un total de 182,794 toneladas de cacao.

2.2.3.2. CCN-51.

En cuanto al cacao CCN-51, pertenece a la familia Euphorbiaceae, un árbol natural de pequeña talla, que puede alcanzar 2.50 metros de altura y produce aproximadamente 250 mazorcas en un árbol de cacao. Es un fruto de varios años de investigación en hibridación de plantas, puesto que fue ejecutado de forma acertada por el ambateño Homero Castro Zurita en la ciudad de Naranjal (Provincia del Guayas), en el año de 1965. Luego de varias investigaciones logró el denominado cacao clonal CCN-51 que significa Colección Castro Naranjal [26].

En la tabla 3 se presentan los requisitos que debe tener la variedad CCN-51.

Tabla 2. Requisitos técnicos del cacao CCN-51

Requisitos	Unidad	CCN-51
100 granos pesan	g	135-140
Buena fermentación (min.)	%	*65
Ligera fermentación (min.)	%	11
Violeta (máx.)	%	18
Pizarroso (máx.)	%	5
Moho	%	1
Totales (análisis sobre 100 pepas)	%	100
Defectuoso (análisis 500 gramos) (máx.)	%	1
Total fermentado (min.)	%	76

*La coloración varia de marrón a violeta

Elaborado por: INEN [27]

La diferencia de la productividad del CCN 51 con otras variedades como el criollo, fino y de aroma es bastante amplia, según los datos de Aprocafa. El grano criollo o nacional tiene una productividad de apenas 6 quintales por hectárea.

2.2.3.3. Criollo.

El cacao criollo produce mazorcas de tamaño mediano, con semillas grandes que pueden ser blancas o ligeramente pigmentadas, aromáticas y de buena calidad; aunque de producción muy baja [28]. Esta variedad representa los cacaos originales, cuyas plantaciones más antiguas se remontan al siglo XVII. Cultivado al principio en Venezuela, México y América Central, aunque actualmente se han redescubierto plantas de este material en Nicaragua, Guatemala y Sri Lanka. Este es considerado como el “príncipe de los cacaos”, siendo famoso por su finura y sus aromas poderosos; sin embargo, la superficie cultivada representa sólo el 5 % de la producción mundial, por su fragilidad frente a las enfermedades e insectos. Las almendras de este material son principalmente destinadas a chocolatería de alta gama [29].

2.2.3.4. Forastero Amazónico.

El cacao Forastero o Amazónico produce mazorcas pequeñas inicialmente de color verde y al madurar cambia a color amarillo [28]. Este grupo es muy diversificado y representa especies mucho más resistentes y productivas que el cacao Criollo. En principio fueron cultivados en la Alta Amazonia; sin embargo, hoy constituyen la producción principal de África del oeste. A pesar de que este cacao abarca el 80 % de la producción mundial total, sus almendras son de calidad ordinaria, con un aroma poco pronunciado y una amargura fuerte y corta; por lo que, se emplean en la fabricación de los chocolates corrientes [29].

2.2.3.5. Trinitario.

El cacao Trinitario es un híbrido que resulta de la mezcla de materiales Criollo y Forastero, con diferentes grados de cruzamiento. Este fue exportado por los colonos españoles quienes habían establecido plantaciones en Trinidad, actualmente representa el 15% de la producción mundial. Dentro de este grupo se encuentra el híbrido CCN-51, cuya principal característica es la alta resistencia a enfermedades y elevada productividad [28]. Las almendras de este tipo presentan un alto contenido de manteca de cacao y no tienen atributo puro a su especie; dando lugar a almendras de calidad media a superior [30].

2.2.4. Proceso postcosecha.

El procesamiento postcosecha del cacao comprende un conjunto de prácticas interrelacionadas, asociadas con la transformación biológica que deben sufrir las semillas o almendras de cacao, después de la etapa de recolección. Las primeras fases del proceso de postcosecha permiten potenciar la calidad y alcanzar los requerimientos demandados por los procesadores de la industria chocolatera y el mercado exterior. Este inicia con la recolección de las mazorcas en el campo, de donde son extraídas las almendras para su posterior fermentación.

Al momento que los granos del cacao son extraídos de la mazorca, comienza la acción de numerosos microorganismos responsables de la fermentación de las semillas. Estas son almacenadas en sacos plásticos, bodegas, habitaciones o cajas cubiertas; que después del contacto con las manos e implementos es inoculado y desaparece el mucilago después de dos a cinco días de iniciar la fermentación [31]. El tipo de microorganismos y el tiempo de fermentación dependerán de la composición química del grano en baba, la zona productora

y la temperatura. Por lo general, las levaduras se desarrollan mejor en este medio; puesto que, en condiciones anaerobias, pH ácido y alto contenido de azúcares tienen un rápido incremento; declinando después de 24 horas [29].

Inmediatamente al terminar la fermentación, el cacao debe someterse al secado. Esto se hace porque si se deja más tiempo en los cajones puede ocurrir una sobre fermentación que predispone los granos al ataque de insectos y a enmohecerse; además, de tomar un olor desagradable. El secado es indispensable para facilitar el transporte, manejo, almacenamiento y comercialización del grano de cacao. Después de fermentado el cacao queda con más o menos 55% de humedad pero ésta se debe reducir a un margen entre 6.5 a 7.5% como garantía para que se pueda vender o almacenar por algún tiempo [26].

En la etapa del tostado se dan las reacciones necesarias para la formación de los compuestos que finalmente determinan el aroma, sabor y color característico del grano, pero también es la etapa en la que disminuye la cantidad de polifenoles presentes en la almendra de cacao, debido a que involucra calentamiento (aumento de temperatura) por un determinado intervalo de tiempo [32]. El descascarillado es una etapa de procesamiento del cacao que se realiza después de la limpieza y eliminación de impurezas provenientes de residuos de mazorca o alguna de las etapas anteriores al secado [33].

2.2.5. Cascarilla de cacao.

La cascarilla de cacao es un residuo o desecho que constituye alrededor del 12% del peso total de la semilla seca [34]. Es una muy buena fuente de macronutrientes como proteínas, carbohidratos, fibra y lípidos; además de micronutrientes como vitaminas y minerales (Tabla 3). Por el contenido de fibra y el bajo porcentaje de grasa (2,85 a 3,14%), este desecho agroindustrial es considerado como un producto de bajo contenido energético (2.85 a 3.14%) [35].

En este proceso se elimina la cascarilla, la cual constituye la cubierta exterior de la semilla del cacao. Indiferentemente de los distintos fines que se persigan con los granos del cacao en la industria, todos deben someterse primero a un proceso de descascarillado antes de su transformación en pasta o licor de cacao. Sin embargo, ésta puede presentar componentes bioactivos similares a las almendras de cacao, como los polifenoles y flavonoides con importantes funciones fisiológicas en organismo humano, mismas que están asociadas a su actividad antioxidante [36].

Tabla 3. Composición proximal de la cascarilla de cacao

Parámetro	Porcentaje (%)
Humedad	3,73
Cenizas	5,69
Grasa cruda	6,87
Proteína cruda	16,93
Fibra dietética soluble	11,08
Fibra dietética insoluble	48,94
Polifenoles	4,85

**Los resultados se reportan en base seca*

Elaborado por: Nsoratindana *et al.* [36]

2.2.6. Polifenoles.

Los polifenoles son compuestos que presentan una estructura molecular que se caracteriza por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos fitonutrientes son indispensables para funciones fisiológicas vegetales, actuando como sistemas de defensas ante situaciones de estrés biótico, mostrando propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antimutagénicas [14]. En la industria alimentaria estos suelen emplearse por su capacidad de retardar o impedir la oxidación de los alimentos (5). En las personas la ingesta de antioxidantes tiene efectos positivos, debido a que previene el desarrollo de enfermedades crónicas como el alzhéimer o el cáncer, mismas que, son el factor desencadenante del daño oxidativo; así como la reparación de los tejidos corporales y el mantenimiento de la piel; sirve para cuidar el estado de los huesos, el cabello, las uñas y los dientes y ayuda a mejorar la visión [36].

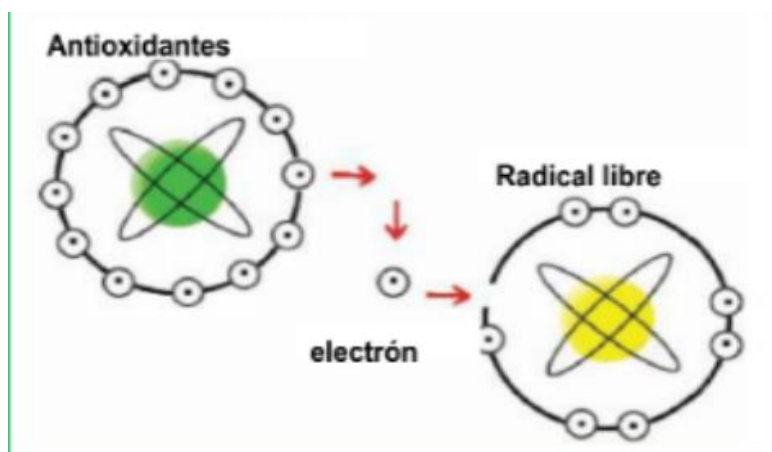


Figura 2. Mecanismo de actividad de antioxidantes de los polifenoles

El mecanismo antioxidante de los polifenoles se atribuye a su capacidad para retardar, prevenir o neutraliza la oxidación de otras moléculas como los radicales libres. Para esto, una especie (polifenoles) cede electrones a otra (radicales libres), por lo que, la especie que gana electrones se reduce y la que pierde se oxida (Figura 3). Entre los antioxidantes hay varias familias de principios activos como los polifenoles y los fitoestrógenos. Entre los primeros se encuentran los flavonoides y los taninos [37] [38] cuyos principales compuestos presentes en las almendras de cacao se localizan en tres grupos, las catequinas o flavan 3-ol (37%) , las antocianinas (4%) y las procianidinas con el 58% (31). Del primer grupo, la epicatequina es casi la única molécula que compone el grupo (cerca del 98% del total de catequinas), aunque las procianinidinas sean el principal componente fenólico en almendras de cacao [39].

2.2.7. Capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante, consecuencia de la presencia y estructura química de los polifenoles, ha centrado su interés en los posibles efectos beneficiosos para la salud de aquellos alimentos y bebidas ricos en antioxidantes [40]. Estudios previos demostraron que es posible obtener extractos de fenólicos a partir de la cascarilla de cacao con un contenido de polifenoles totales que varía entre 60 - 91mgEAG/g [41].

2.2.7.1. Antioxidantes enzimáticos.

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos a las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), como es el caso de superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-PX) entre otras [37].

2.2.7.2. Antioxidantes no enzimáticos.

Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como selenio, zinc, o vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E), éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes [37].

2.3. Marco referencial.

2.3.1. Investigaciones previas.

En el trabajo realizado por Tolentino [37], se investigaron cuatro muestras de cascarillas de cacao de la zona de Tingo María (CTM), San Alejandro (CSA), Santa Lucía (CSL) y Planta Industrial Naranjillo (CPI); se evaluó la composición química proximal, polifenoles totales (PT), capacidad antioxidante (CA), antocianinas (A), teobromina (Tb), cafeína (Cf) y en la infusión obtenida del filtrante elaborado, se determinó Tb y Cf. Se analizó estadísticamente con un diseño DCA y la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$); se utilizó el software STATGRAPHICS Centurión XV II. Se determinó el mayor contenido de polifenoles en la cascarilla de Santa Lucía con $3,90 \pm 0,049$ g AGE/100g, y el menor contenido correspondió a la cascarilla de Tingo María con $2,67 \pm 0,227$ g AGE/100g.

Zapata *et al* [42], evaluó el efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. en los clones estudiados se determinó el contenido de fenoles totales, antocianinas totales y taninos condensados, mediante métodos espectrofotométricos; así como catequina, epicatequina, teobromina y cafeína por cromatografía líquida de alta resolución. La capacidad antioxidante se evaluó mediante las metodologías del DPPH, FRAP, ORAC y la capacidad atrapadora de radicales superóxido. El efecto de la fermentación sobre los clones de cacao no fue uniforme, observándose tanto cambios positivos como negativos en los contenidos de los diversos metabolitos secundarios y la actividad antioxidante, en dependencia de la variedad. Sin embargo, los cambios en la actividad antioxidante expresada como TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) DPPH están correlacionados con los diversos cambios en el contenido de fenoles totales durante el proceso de fermentación y descritos por la expresión siguiente: $DDPPH = 6,36099 * D_{\text{fenoles}} + 5,10923$, con $r^2 = 0,982$.

Niemenak [43] en el estudio comparativo de diferentes clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en términos de su contenido de fenólicos y antocianinas, determinó que los polifenoles se analizaron a 280 nm mediante un dispositivo de HPLC usando un detector de matriz de fotodiodos (PDA). Las antocianinas se separaron con la columna SEP-PAK Vac 6cc 1000 mg (Waters) y se midieron a 520 nm con una PDA. Se analizaron diecinueve clones de cacao del banco de germoplasma de Camerún. Se utilizaron semillas frescas y similares a fermentadas. En nuestras muestras estuvieron presentes dos polifenoles principales:

catequina y epicatequina. La epicatequina representa del 2 al 4% de MS de la semilla de cacao en polvo desgrasada.

También se encontraron sustancias indefinidas llamadas A, B y C en las semillas de cacao. La sustancia A se analiza como un derivado del ácido cafeico y un compuesto unido a un éster. Las sustancias B y C son oligómeros de proantocianidinas.

No se detectaron ácido protocatequico ni quercetina. Se encontraron dos antocianinas en las semillas de cacao: cianidin-3-galactósido y cianidin-3-arabinósido. Representan 0.02-0.4% MS de polvo de semilla de cacao desgrasado. Los fenoles totales, catequina, epicatequina y antocianina en frijoles frescos y fermentados fueron dependientes del genotipo. Los polifenoles de semillas de dos vainas diferentes del mismo clon mostraron una diferencia significativa cuantitativa. La prueba de correlación de Spearman mostró que no existe correlación entre el número de semillas por vaina, el peso de la vaina y el contenido de compuestos polifenólicos; encontrándose una correlación negativa entre el número de semillas por vaina y el contenido de catequinas.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

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

Tabla 4. Localización de la investigación

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

Elaborado por: Loor, 2020

3.2. Tipos de investigación.

Para el desarrollo de este trabajo se aplicó investigación cuantitativa puesto que la fundamentación teórica del estudio se realizó con una revisión bibliográfica que permitió analizar el fenómeno de manera directa, mediante técnicas experimentales específicas, como se detalla a continuación:

3.2.1. Investigación descriptiva.

A partir de la investigación descriptiva se determinó las relaciones y aspectos de los fenómenos en estudio lo que permitió conocer las variables y señalar lineamientos.

3.2.2. Investigación exploratoria.

A través de la investigación exploratoria se permitió integrar teorías para explicar los fenómenos. Esto nos permitió recaudar información para reconocer, ubicar y definir el problema. De igual manera se logró fundamentar la hipótesis, establecer el esquema y la metodología definitiva de la investigación

3.2.3. Investigación experimental.

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

3.3. Métodos de la investigación.

3.3.1. Método inductivo-deductivo.

Para la ejecución del trabajo de investigación se aplicó el método inductivo-deductivo, puesto que para la obtención de los resultados se parte de un problema como es la acumulación de residuos de la industria cacaotera y chocolatera. Este método permitió hallar posibles soluciones para el aprovechamiento industrial de los componentes bioactivos de la cascarilla. Además de brindará los conocimientos que permita establecer las condiciones tecnológicas adecuadas y los parámetros fisicoquímicos apropiados para este estos residuos [44].

3.3.2. Método experimental

A través del método experimental se trabajó sobre los objetos de estudio para esto se observó los resultados de los perfiles de polifenoles, flavonoides y se compararon con la capacidad antioxidante de la cascarilla de cacao [44].

3.4. Fuentes de recopilación de información.

3.4.1. Fuentes primarias.

Las fuentes primarias de información que se emplearon en el desarrollo de este trabajo de investigación estuvieron compuestas por trabajo de campo y pruebas de laboratorios a través de: recolección de cascarilla de cacao (CCN-51 y Nacional), pre-ensayos, cuantificación del contenido de polifenoles y flavonoides totales presentes en la cascarilla de cacao.

3.4.2. Fuentes secundarias.

Las fuentes secundarias de la recopilación de la información sirvieron para la obtención de material bibliográfico referencial, a través de estos recursos bibliográficos se pudo plantear el desarrollo metodológico de la investigación, así como el análisis e interpretación de resultados a través de diferentes fuentes bibliográficas como: libros, artículos científicos, revistas científicas, tesis doctorales, trabajos fin de máster y tesis de pre-grado.

3.5. Diseño de la investigación.

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

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$ H_0 : No existe un efecto de la variedad (Nacional y CCN-51) en el contenido de polifenoles, flavonoides totales y vitamina C de la cascarilla de cacao.
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ H_1 : Existe un efecto de la variedad (Nacional y CCN-51) en el contenido de polifenoles, flavonoides totales y vitamina C de la cascarilla de cacao.

3.5.1. Esquema del análisis de varianza.

En la Tabla 5 se presenta el esquema del ANDEVA para la prueba “t” de Student de dos muestras emparejadas. Mediante el estadístico “t” de Student, se evaluó el efecto de la variedad de cacao en los componentes antioxidantes de las muestras de cascarilla.

Tabla 5. Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (Nacional y CCN-51) en el contenido de polifenoles y flavonoides totales y vitamina C en la cascarilla de cacao.

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

Elaborado por: Loor, 2020

3.5.2. Análisis de correlación.

Para determinar los compuestos antioxidantes responsables de la capacidad antioxidante de las muestras de cascarilla de cacao se aplicó el análisis de correlación de Pearson (Tabla 6), a través del cual se identificó el grado de correlación que existe entre el contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales con la actividad antioxidante in vitro de las muestras estudiadas. Los valores de capacidad antioxidante de las muestras de cascarilla de cacao fueron tomados del trabajo de investigación realizado por Coronel (2020) quien

estudió la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao L.*) proveniente de las variedades CCN51 y Nacional por distintos métodos (ABTS, FRAP y ORAC).

Tabla 6. Matriz de correlación para relacionar el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) y vitamina C de cascarilla de cacao con la actividad antioxidante.

Capacidad antioxidante	Antioxidantes		
	Polifenoles (x)	Flavonoides (y)	Vitamina C (z)
*ABTS (x)	r_{xx}	r_{xy}	r_{xz}
**FRAP (y)	r_{yx}	r_{yy}	r_{yz}
***ORAC (z)	r_{zx}	r_{zy}	r_{zz}

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

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

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

Elaborado por: Loor, 2020

3.6. Procedimiento experimental.

3.6.1. Muestreo.

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

3.6.2. Fermentación y secado del cacao.

El proceso postcosecha de las muestras recolectadas de cacao se realizó en el Centro de fermentación y secado de la Asociación “La Cruz”, ubicada en el cantón Mocache provincia de Los Ríos. De cada fruto se extrajeron los granos con la ayuda de un machete y se extrajeron los granos recubiertos de mucílago, formando una masa de 45 kg por cada variedad, luego fueron fermentadas en cajas de madera de laurel (dimensiones 100 cm de alto x 100 cm de ancho x 95 cm de profundidad), con una capacidad de 150 kg de masa, ubicadas en forma de escalera de tres pisos.

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

Las almendras fermentadas se secaron al sol durante 7 días hasta obtener una humedad aproximada de 7%. Luego de esto, el grano se llevó a un tostador de placas, donde se realizó la torrefacción de las almendras durante 45 min. Las muestras de cascarilla de cada variedad de cacao se obtuvieron con ayuda de un descascarillador mecánico (10 a 20 min). Tanto la fase de tostado como el de descascarillado se realizaron en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue.

3.6.3. Preparación de las muestras.

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

3.7. Contenido de antioxidantes totales.

3.7.1. Extracción de compuestos fenólicos.

Para la extracción de los componentes fenólicos se pesaron 0.3 g de cascarilla de cacao y se añadieron 0,005 L de una disolución de metanol, agua, ácido fórmico (70:30:0,1 %; v/v/v). El proceso de extracción se realizó durante cuatro ciclos combinados de agitación (agitador-incubador VWR, USA) e inmersión en un baño de ultrasonidos (baño de ultrasonido Selecta; arcelona, 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 de cada ciclo de extracción se recolectó en un matraz volumétrico y se enrasó a 25 mL con la disolución extractora. La disolución obtenida se empleó para la cuantificación de polifenoles y flavonoides totales por los métodos propuestos.

3.7.1.1. Extracción de Vitamina C.

Para la extracción de Vitamina C de las muestras de cascarilla de cacao, se pesaron 0.3 g de muestra y se añadió 10 mL de una solución etanólica al 95% (etanol/ agua; 95/5; % v/v). Las muestras fueron colocadas en un baño de ultrasonido (Fisher Scientific/Ultrasonic batch 5,7L) con control de temperatura durante 20 minutos y se agitó el balón cada 5 minutos. Posteriormente se dejó acondicionar la muestra a temperatura ambiente y se aforó a 25mL con el diluyente. Después de aforar las muestras se filtró con ayuda de un filtro jeringa de 0,45 μm y se colocó en viales de HPLC, ámbar.

3.7.2. Determinación de antioxidantes totales.

3.7.2.1. Validación de los métodos.

Para la determinación de Polifenoles y Flavonoides totales se realizó la validación de los métodos experimentales en base a los siguientes criterios:

3.7.2.2. Linealidad.

Mediante la linealidad se determinó la capacidad de los métodos empleados para dar una respuesta simétrica a la concentración del analito. Para esto se elaboró curvas de calibración en intervalos de 0 a 100 ppm; empleando estándares de ácido gálico (polifenoles) y catequina (flavonoides), durante 3 días. A partir de las concentraciones definidas (X) y el promedio (n=3) de las lecturas de absorbancia (Y) se obtuvo unas curvas de calibración promedio. La validación de las curvas se realizó en base a un estudio de regresión lineal, en el cual se determinaron parámetros como la pendiente (m), el coeficiente de determinación (R^2) y el intercepto (a). Para las concentraciones medidas ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) se estableció como criterio de aceptación cualitativo un $R^2 \geq 0,99$.

3.7.2.3. Límites de detección y cuantificación.

Para la determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizaron doce mediciones del blanco o testigo reactivo (que estuvo compuesto por todos los reactivos menos la muestra), de acuerdo a las recomendaciones establecidas en la guía técnica de validación de métodos [46]. A partir de estas mediciones se establecieron el promedio y la desviación estándar (DS). Para el cálculo del LD se estableció la absorbancia promedio del

blanco más tres DS (blanco+3DS). En el caso del límite de cuantificación se expresó como la absorbancia promedio del blanco más seis DS (blanco+6DS). El LD y el LC constituyen la cantidad mínima que puede detectar y cuantificar el método con exactitud y precisión.

3.7.2.4. Exactitud

La exactitud se evaluó como porcentaje de recuperación de los analitos en estudio. Para esto se determinó el número de ciclos de extracción necesarios para obtener el 100% de los antioxidantes (polifenoles y flavonoides totales) siguiendo la metodología establecida para el estudio. En cada extracción se cuantifico el contenido de polifenoles y flavonoides totales y se estableció el porcentaje de recuperación por cada ciclo.

3.7.2.5. Precisión.

La precisión del método se ajustó a través de un ensayo de repetibilidad, para esto se analizó una muestra de cada variedad con cuatro réplicas, bajo las mismas condiciones de ensayo (analista, laboratorio y equipo) siguiendo la metodología establecida para el estudio, en un mismo día. A partir de las mediciones se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (102). Con los resultados se verificó que el método tenga la precisión adecuada para el nivel de concentración medida ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) utilizando la ecuación de Horwitz ($\text{CV}_{\text{Horwitz}}$). Este parámetro es utilizado para la validación de ensayos interlaboratorios, y se relaciona el CV en función de la concentración del analito, como se muestra en la Figura 3, también conocida como trompeta de Horwitz.

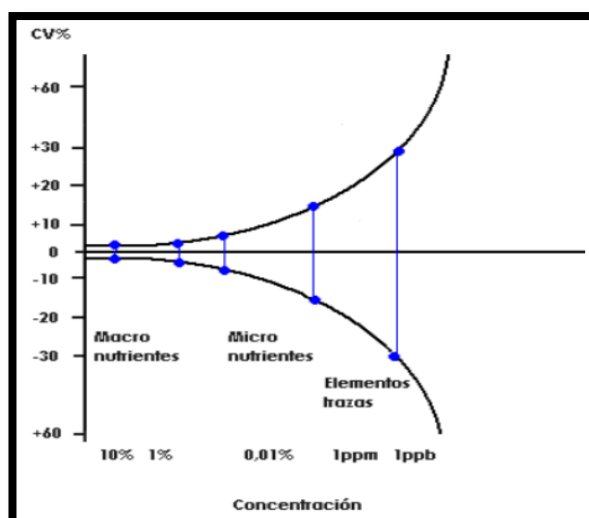


Figura 3. Trompeta de Horwitz

3.7.3. Cuantificación.

3.7.3.1. Polifenoles totales.

El contenido de polifenoles totales (TPC) se determinó mediante el método descrito por Samaniego *et al.* [48]. Para esto se tomó una alícuota de la muestra y se mezcló con el reactivo Folin-Ciocalteu y Na_2CO_3 al 20%. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-VIS 2.600 Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados 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 TPC se expresó en términos de mg de Ácido Gálico GAE por cada 100 g de muestra en base seca (BS).

3.7.3.2. Flavonoides totales.

El contenido de Flavonoides totales (TFC) se determinó de acuerdo con el método descrito por Zhishen, *et al.* [49]. Para esto se tomó una alícuota de la muestra previamente extraída en una solución metanólica y se hizo reaccionar con Nitrato de Sodio, Cloruro de Aluminio e Hidróxido de Sodio. La absorbancia de la mezcla se midió con la ayuda de un Espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 2.600 (Shimadzu, Kyoto, Japón) a 490 nm. El TFC se determinó utilizando una curva de calibración de catequina ($y = 0,0036x + 0.0678$, $R^2 = 0,9994$) medida por triplicado durante 3 días ($n = 9$). Los resultados se expresaron en mg de catequina por cada 100 g de peso en base seca (BS) [45].

3.7.3.3. Vitamina C.

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

Para el análisis, se inyectaron 10 μL de muestra en el equipo (autoinyector G1329A) y se fueron eluyendo, a un caudal de 1.0 ml/min utilizando como fase móvil ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; 0.01 N) a una temperatura de 30 °C. La elución de la fase móvil se realizó en isocrático; durante 67 min. La identificación y cuantificación se realizó por comparación con estándares de ácidos orgánicos (ascórbico, cítrico, oxálico, málico y fumárico) (76).

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Recursos humanos.

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

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

3.8.2. Materia prima

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

3.8.3. Materiales de laboratorio.

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

3.8.4. Reactivos.

- Ácido fórmico (pureza 99 %)
- Ácido gálico estándar (pureza 98 %)
- Etanol (grado analítico 99,9 %)

- Hexano (ACS, 98 %)
- Metanol gradiente analítico (98 %)
- Acetato de potasio (pureza 99 %)
- Agua destilada
- Agua bidestilada
- Fosfato de sodio monobásico
- Fosfato de sodio dibásico
- Persulfato de potasio
- Ferrocianida de potasio
- Ácido tricloroacético (10%)
- Cloruro férrico (1%)

3.8.5. Equipos.

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

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Índice de rendimiento.

En la figura 4 se indica el porcentaje de residuos generados durante el proceso de beneficiado del cacao. Donde, ese tomó el promedio de 10 muestras de cacao por variedad, datos que se muestran en el Anexo 2. En la variedad de cacao Nacional se obtuvieron porcentajes de residuos en cáscara (74.08%), mucílago (9.17%), secado (7.97%), almendra seca (4.39%), cascarilla (0.92%) y semilla descascarillada (3.47%). En cuanto a la variedad CCN-51 se obtuvieron valores de cáscara (69.71%), mucílago (10.18%), secado (10.73%), almendra seca (4.69%), cascarilla (0.94%) y semilla descascarillada (3.75%).

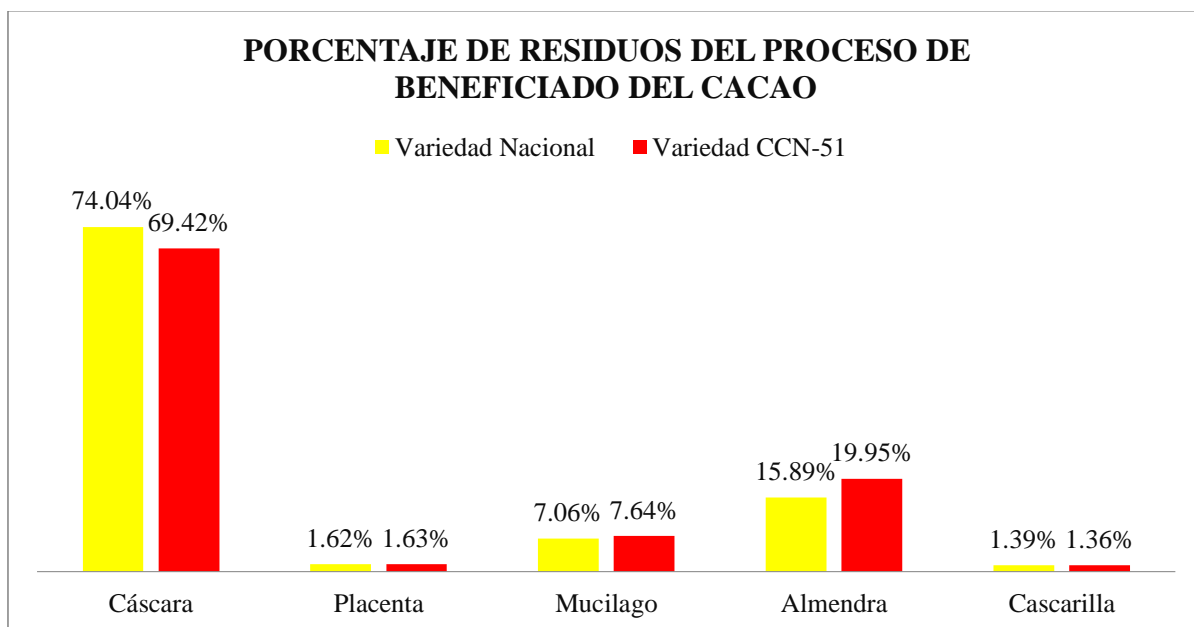


Figura 4. Porcentaje de residuos del cacao

En la Tabla 7 se presenta el índice de rendimiento de las variedades de cacao Nacional y CCN-51, tomando el promedio de las 10 muestras descritas.

Para determinar el rendimiento se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso semilla descascarillada (g)}}{\text{Peso inicial de la mazorca (g)}} * 100$$

Se puede observar que en la variedad de cacao Nacional se obtuvo un rendimiento del 1.39% de cascarilla de cacao, mientras que en CCN-51, un 1.36% de rendimiento.

Tabla 7. Índice de rendimiento de las variedades de cacao Nacional y CCN-511

Rendimiento	Nacional	CCN51
Peso Mazorca (gramos)	441.80	439.07
Cascarilla (gramos)	6.13	5.97
Rendimiento	1.39	1.36

Elaborado por: Loor, 2020

4.2. Validación de los métodos.

4.2.1. Linealidad.

Dentro de la validación del método se realizó el estudio de la linealidad de las curvas de calibración de Ácido Gálico para Polifenoles totales y de Catequina para Flavonoides totales durante 3 días en intervalos 0 a 100 ppm. Para lo cual, se emplearon las medias de absorbancias de las curvas elaboradas en tres diferentes días. Los análisis estadísticos de la linealidad se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración en Polifenoles y Flavonoides totales

MUESTRA	PROMEDIO	
	Polifenoles	Flavonoides
Pendiente (m)	0,0089	0,0036
ordenada al origen (Lo)	0,0229	0,0678
Error típico (Sy, x)	0,0612	0,0053
Desviación estándar de la pendiente (Sm)	0,0007	0,0001
Desviación estándar de la ordenada (S _{Lo})	0,0417	0,0039
Coefficiente de determinación (R²)	0.9989	0.9994
t_{student} calculado	40.62	67.84
t_{student} tablas	2.57	2.57
m (mínimo)	0,0070	0,0034
m (máximo)	0,0109	0,0037
Lo (mínimo)	-0,0928	0,0571
Lo (máximo)	0,1386	0,0785

Elaborado por: Loor, 2020

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 8, las curvas de calibración desarrolladas para polifenoles y flavonoides totales presentaron coeficientes de determinación (R^2) de 0.9989 y 0.9994; respectivamente. Estos resultados indican que existe una alta correlación

entre la concentración de los estándares (X) y la absorbancia (Y) ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$); por lo tanto, el 99,9 % de la variabilidad de los datos experimentales pudo ser explicada por los modelos de regresión obtenidos [50]. En la Figura 5, se presenta las curvas de calibración promedio empleadas para la cuantificación del contenido de antioxidantes totales de las muestras en estudio.

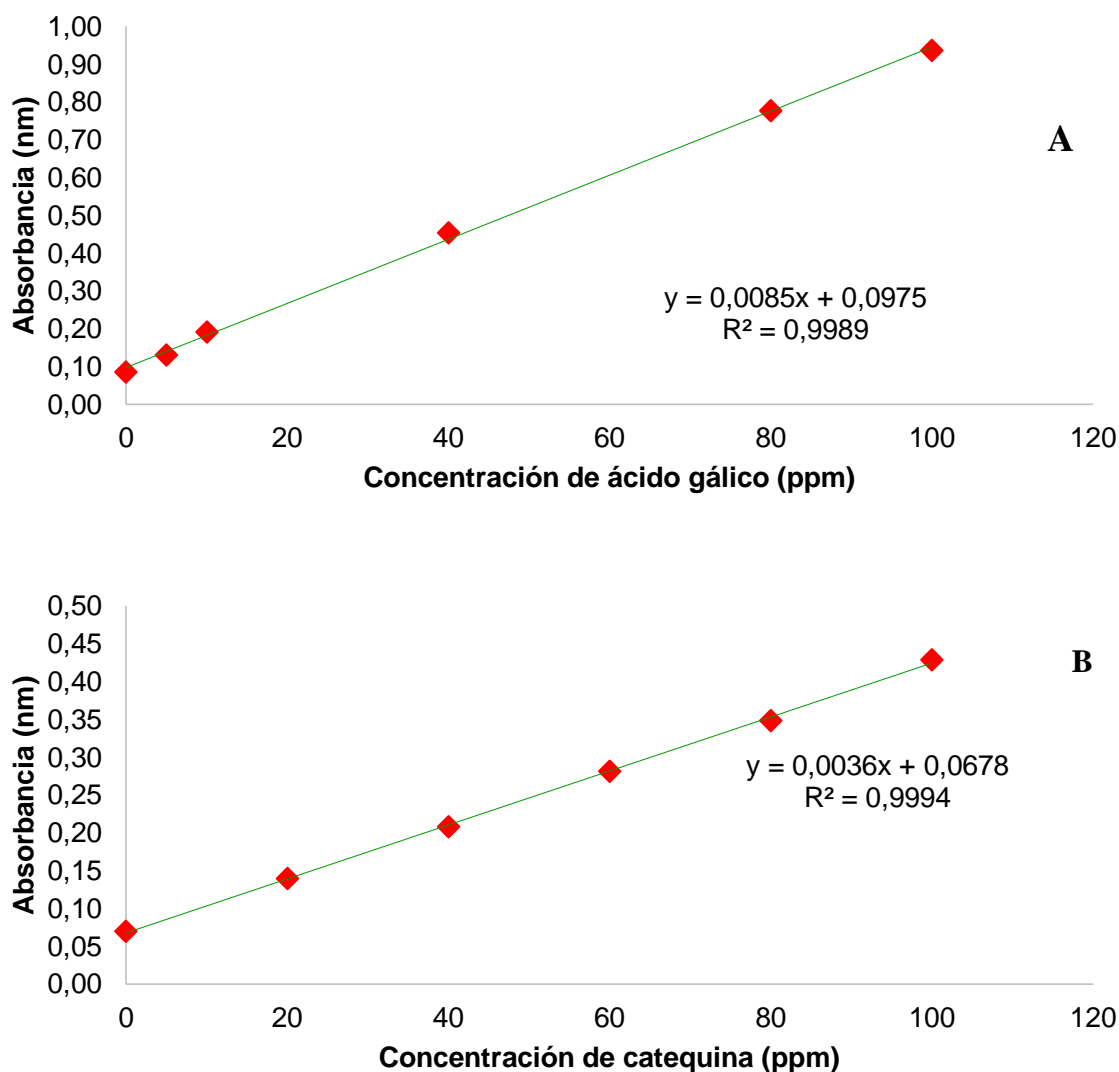


Figura 5. Curvas de calibración promedio para la determinación de polifenoles y flavonoides totales por concentración de ácido gálico (A) y catequinas (B).

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 5, las curvas de calibración de polifenoles y flavonoides, mostraron un ajuste lineal adecuado ($R^2 \geq 0,99$) en todos los casos. Por lo cual se estableció que existe una alta correlación entre la señal analítica

(absorbancia) y la concentración, comprobándose que el equipo y los analistas proporcionan resultados confiables.

4.2.2. Límites de detección y cuantificación.

Con la finalidad de determinar la concentración mínima de analito que puede detectar el equipo utilizado, se estudiaron parámetros como el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Como se puede observar en la Tabla 9, los valores de estos límites dependen de la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco a un nivel de confianza dado.

Tabla 9. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del contenido de Polifenoles y Flavonoides totales

MUESTRA	PROMEDIO	
	Polifenoles	Flavonoides
Lc (concentración mg•L ⁻¹)	9.0709	4.9635
Ld (concentración mg•L ⁻¹)	7.3905	2.6720
Lc (concentración mg•g ⁻¹)	0.7559	0.4136
Ld (concentración mg• g ⁻¹)	0.6159	0.2227
Lc (concentración mg•100 g ⁻¹)	75.5905	41.3628
Ld (concentración mg•100 g ⁻¹)	61.5878	22.2666

Elaborado por: Loor, 2020

Para el contenido de antioxidantes totales de (polifenoles y flavonoides totales) se obtuvieron LC de 75.590 y 41.3628 mg•100g⁻¹, respectivamente. Mientras que los LD fueron de 61.5878 y 22.2666 mg•100 g⁻¹ para polifenoles y flavonoides, similares a lo expuesto según Sandoval [50].

4.2.3. Exactitud.

Como parte de la validación de los métodos se evaluó el rendimiento del proceso de extracción, tal como se indica en la Figura 6.

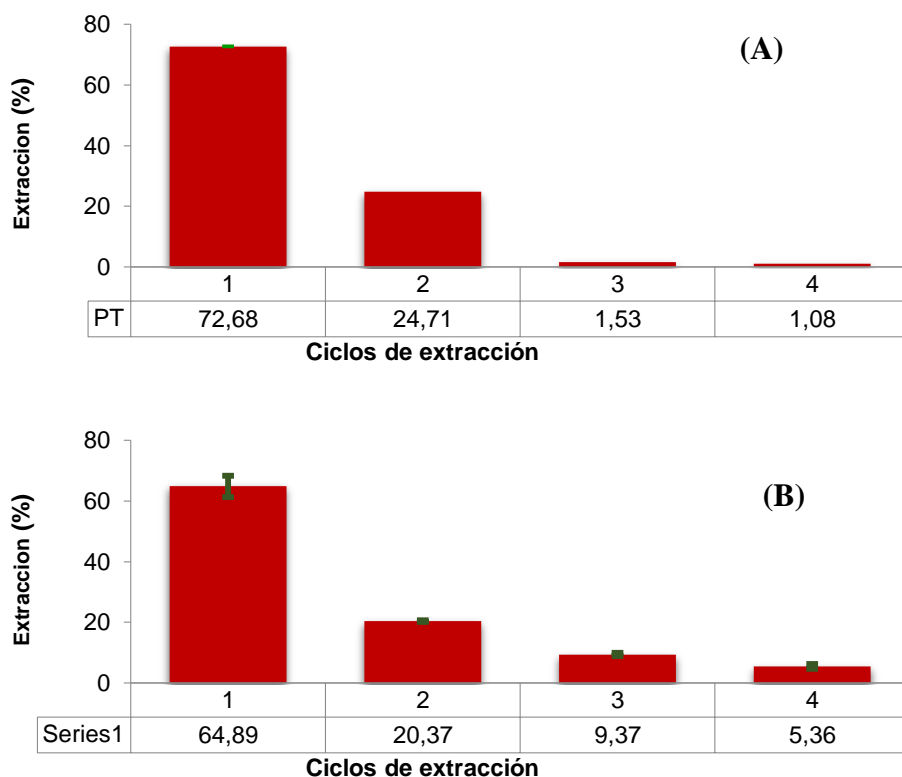


Figura 6. Recuperación de los componentes bioactivos responsables de la capacidad antioxidante en polifenoles (A) y flavonoides totales (B) en muestras de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 en función de los ciclos de extracción

En esta etapa, se determinó el número de ciclos necesarios para recuperar el 100% de los antioxidantes presentes en cada muestra de cascarilla, empleando una disolución metanólica (metanol/agua/ácido fórmico; 70/30/0.1 %; v/v/v). De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 6, se necesitan al menos cuatro ciclos combinados agitación (5 minutos) e inmersión en un baño de ultrasonidos (10 minutos) y centrifugación (10 minutos), para alcanzar el 100 % de la recuperación de estos componentes. Los porcentajes de extracción obtenidos tras el primer ciclo de recuperación fueron de 64.89 % para Flavonoides y 72.68 % en polifenoles totales (A). Los altos porcentajes de recuperación de este método de extracción se debe a que en medio alcohólicos acidificados (metanol/acido fórmico) se favorece la obtención de antioxidantes hidrófilos predominantes en la cascarilla de cacao (polifenoles, flavonoides) [51].

4.2.4. Precisión.

Una vez validado el proceso de extracción, se procedió a la validación de los métodos de cuantificación, para esto se estableció el error experimental de las técnicas espectrofotométricas en base a la repetibilidad, la misma que se estableció midiendo el contenido de polifenoles y flavonoides en una muestra con cuatro réplicas como se detalla en la Figura 7.

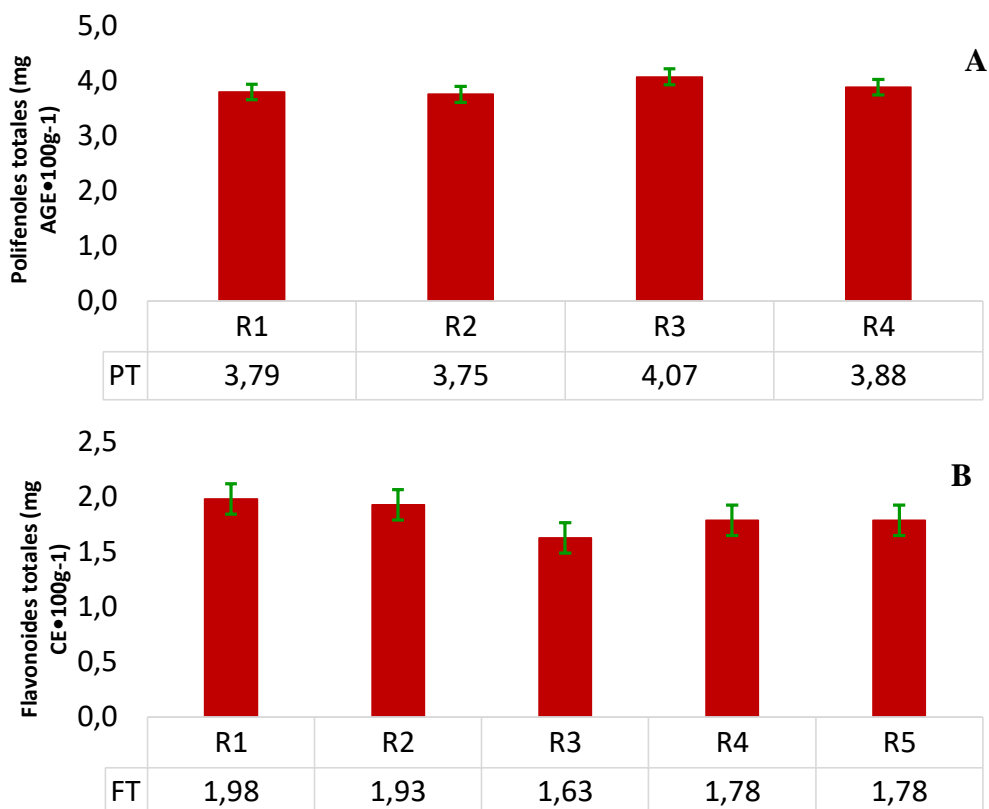


Figura 7. Resultados del estudio de precisión de los métodos para la determinación de capacidad antioxidante de polifenoles (A) y flavonoides totales (B) en muestra de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 en función de los ciclos de extracción

Los resultados del ensayo de repetitividad presentados en la Figura 7, demostraron que los métodos presentan un contenido promedio de polifenoles totales de $3,87 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ y $1,82 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para flavonoides totales. En los dos métodos, el coeficiente de variación (CV) fue de 3.64 (polifenoles) y 7.62% (flavonoides), dentro de los límites (5-8%) establecidos en la trompeta de Horwitz (Figura 3), para concentraciones de $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Estos resultados demostraron que los métodos utilizados para la determinación del contenido de antioxidantes totales presentan una precisión adecuada, por lo cual, se encuentran aptos para los análisis propuestos.

4.2.5. Polifenoles totales.

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

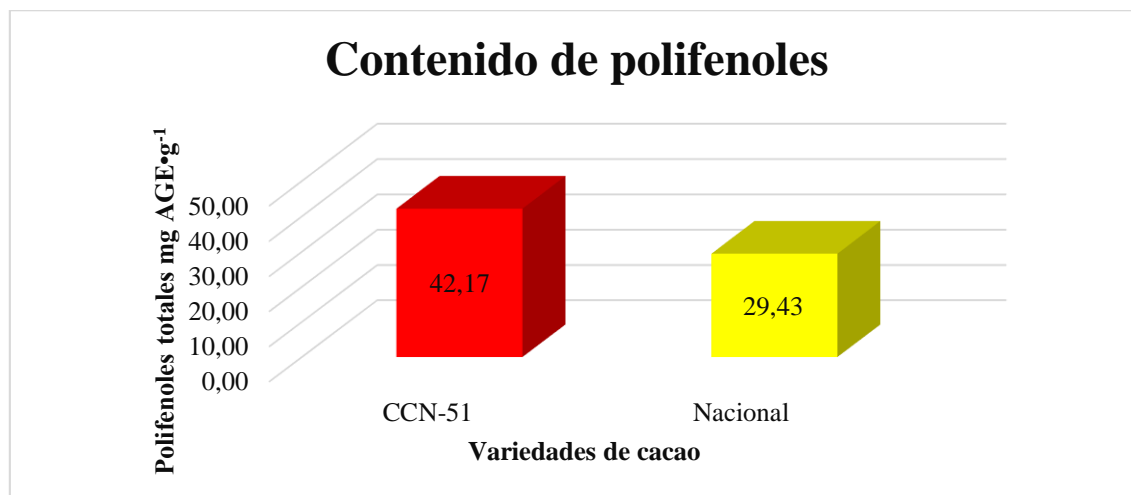


Figura 8. Contenido de polifenoles totales en muestra de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 expresado en mg AGE•100g⁻¹

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 8, se estableció que las muestras de cascarilla de cacao de la variedad CCN-51 (42.17 mg AGE•100g⁻¹) presentó un mayor contenido de polifenoles totales (TPC) que las muestras de la variedad Nacional (29.43 mg AGE•100g⁻¹). Los resultados obtenidos en este estudio están dentro del rango presentado por diferentes autores (Martínez *et al.* [52] y Manzutti *et al.* [53] Tolentino *et al.* [37]), quienes reportaron concentraciones de polifenoles totales de 16,86 a 55,59 g AGE•100g⁻¹ (1687 a 5559 g AGE•100g⁻¹).

Los resultados demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las dos muestras de cascarilla de cacao; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Evidenciándose que existe un efecto de la variedad de cacao en contenido de polifenoles totales de la cascarilla de cacao, con un valor de $p_{\text{calculado}}$ (0,0002727667) inferior al valor de $p_{\text{crítico}}$ (0,05).

La diferencia en los resultados obtenidos frente al trabajo de otros autores, puede atribuirse a varios factores como el tipo de disolventes empleados en el proceso de extracción (Manzzuti *et al.* [53]) y la zona geográfica de procedencia de la muestra (Martínez *et al.* [52]; Tolentino *et al.* [37]). Por lo que estos autores indicaron que dependiendo de la

localidad (Pucacaca y Huingoyacu) y el sistema de solvente utilizado (metanol, agua y Ácido acético) pueden modificar la concentración de estos antioxidantes en las muestras de cacao.

4.2.6. Flavonoides totales.

Dentro del contenido de antioxidantes totales presentes en cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional se determinó la concentración de flavonoides totales, como se muestra en la Figura 9.

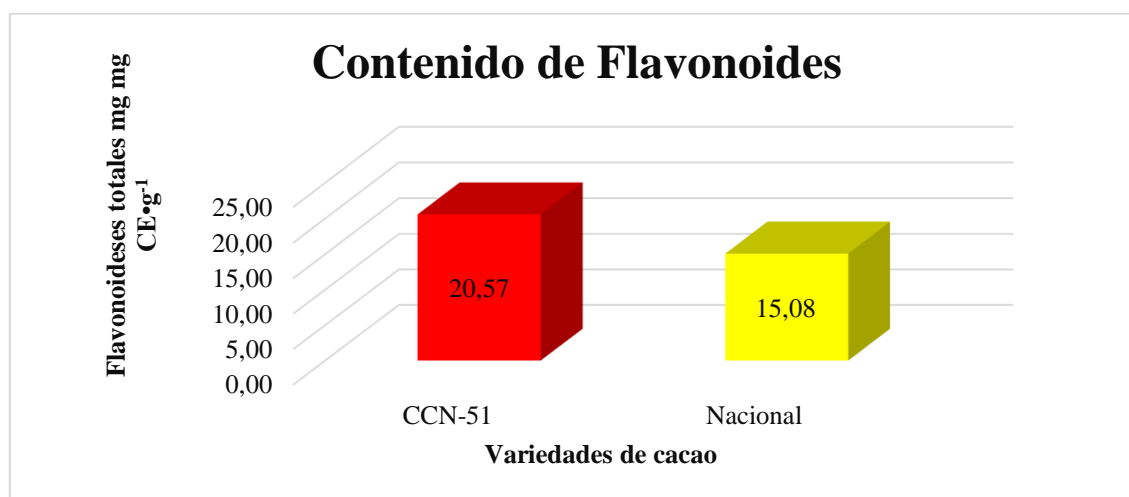


Figura 9. Contenido de flavonoides totales en muestras de cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 expresado en mg CAT·100g⁻¹

De igual manera que, en el contenido de polifenoles totales las muestras de cascarilla de cacao de la variedad CCN-51 presentó un mayor contenido de flavonoides totales (20.57 mg CAT·100g⁻¹) que las muestras de la variedad Nacional (15.08 mg CAT·100g⁻¹), como se muestra la Figura 9. Según Zapata *et al.* [42], estos contenidos disminuyen de 0,59 – 1,60 mg CAT·g⁻¹ (59 – 1,60 mg CAT·g⁻¹) en grano sin fermentar, así como 0,27- 1,05 mg/g en granos fermentados. Los valores reportados son similares a nuestros resultados. Mientras que en el parámetro de flavonoides de la cascarilla de cacao descrito por Gavica [54] fue 8,12 mgEQ/g muestra. El TFC es mayor en las semillas de cacao según indican Tkacz *et al.* [55], viéndose afectado por el proceso de manufactura que sufren las semillas en el tostado y descascarillado.

Al comparar los resultados de antioxidantes totales de la cascarilla de cacao mediante el análisis de correlación de Pearson, se puede conocer que en polifenoles totales se obtuvo un valor de $t = 12.6035$ y, valor-P = 0.000228123 en el análisis estadístico con un nivel de

confianza del 95.0 %. Para el caso de flavonoides totales, el valor de $t = -6.04024$ y valor- $P = 0.00378848$.

Campos *et al.* [56], afirman que la variación y degradación de los compuestos antioxidantes puede deberse a los efectos adversos del calor, otros productos químicos presente en la pulpa, el oxígeno que podría conducir la oxidación y posteriormente a la polimerización. La fermentación y el secado son pasos críticos en el procesamiento del cacao, causan descomposición de las paredes de las células pigmentarias; sus contenidos quedan expuestos a otros componentes dentro del grano y otorgan otras características físicas y organolépticas, como olor y sabor [43].

4.2.7. Vitamina C.

La vitamina C es un compuesto antioxidante presente generalmente en todas las frutas; por lo que, es considerada una de las principales responsables de la actividad antioxidante de las mismas. Con la finalidad de descartar el efecto funcional de esta vitamina, en las muestras de cascarilla de cacao, se procedió a determinar la presencia de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos, por cromatografía líquida HPLC. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 10.

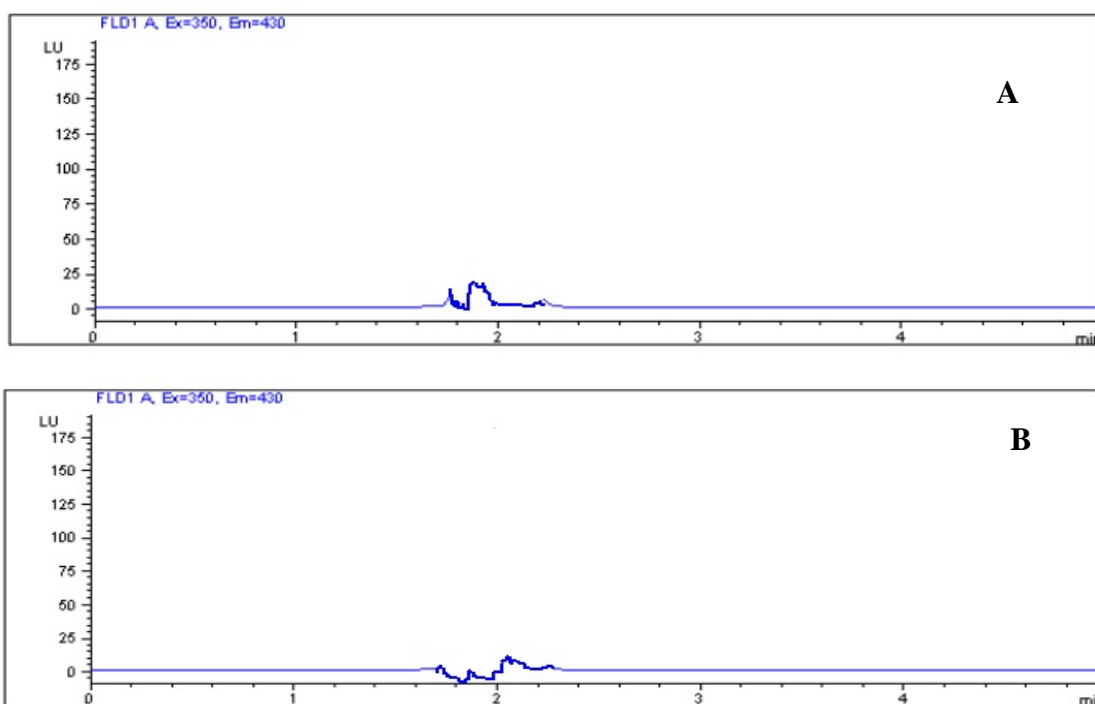


Figura 10. Cromatograma de análisis de ácido ascórbico y otros ácidos orgánicos en cascarilla de cacao CCN-51 (A) y Nacional (B), por cromatografía HPLC.

Según los resultados presentados en la Figura 10, se puede establecer que las muestras de cascarilla de cacao carecen de vitamina C en su composición, al igual que en los nibs de cacao [57]. Según diversos autores [58], si las almendras de cacao crudo presentaran vitamina C en su composición, esta sería fácilmente oxidable en presencia de luz, oxígeno, degradándose durante la etapa de fermentación. Por otro lado, está es altamente termolábil, y se destruye a partir de 45°C; desapareciendo durante el proceso de tostado de las almendras [59] [60].

El mucílago o baba es una sustancia viscosa aromática que cubre las semillas de cacao, por lo que se la conoce como tegumentos. Está pulpa mucilaginosa puede contener hasta el 0.16% de polifenoles, tal como lo indican Vera y Zambrano [61].

Endraiyani *et al.*, [62], en muestras de mucilago de cacao, analizaron los compuestos antioxidantes, empleando una mezcla de disolventes de extracción (acetona/agua/ácido acético). Los valores reportados fueron de 1871 $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$. Los polifenoles que se encuentran en mayor abundancia dentro del cacao son los flavonoides, que actúan como antioxidantes. El cacao puede contener entre 10 y 50 mg de polifenoles, dependiendo del origen y el procesamiento al que han sido sometidos los granos

De acuerdo a Sotelo *et al.* [63], en cuanto a los antioxidantes totales presentes en otros residuos como las cáscaras de mazorca de cacao poseen un alto contenido de polifenoles que varían teniendo en cuenta la técnica de extracción de 23.0 a 16.40 mg EAG/g muestra y una buena capacidad antioxidante que varía con valores FRAP de 16.904,25 a 13.660,13 $\mu\text{M TE}/100\text{ g muestra}$, ABTS de 22.961,57 a 11.603,12 $\mu\text{M TE}/100\text{ g muestra}$ y ORAC de 34.292,71 a 25.150,94 $\mu\text{M TE}/100\text{ g muestra}$.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se pudo establecer que los compuestos bioactivos (antioxidantes), generalmente se acumulan en las partes externas de los frutos de cacao (cascaras, mazorcas, mucilago y placenta) y en otras plantas puede encontrarse en hojas, flores, semillas y tallos, concordando con las investigaciones realizadas por Vriesmann y colaboradores (2011) (114). Por tal motivo, la valorización de la cascarilla de cacao ha recibido un creciente interés en la industria alimentaria, con la finalidad de obtener ingredientes, que pueden cumplir con la función de aditivos o suplementos de alto valor nutricional y funcional.

Según Martínez *et al* [52] la actividad antioxidante de los subproductos del cacao (cáscara de vaina, almendra y mucílago) podrían atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos polifenoles, flavonoides.

En la Tabla 10, se presenta los resultados del análisis de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC y los contenidos de polifenoles y flavonoides totales presentes en la cascarilla de cacao. Para el análisis de correlación se tomó los valores de capacidad antioxidante del trabajo de Coronel (2020) quien estudio la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) proveniente de las variedades CCN51 y Nacional por distintos métodos (ABTS, FRAP y ORAC).

Tabla 10. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides totales) de cascarilla de cacao con la actividad antioxidante por ABTS, FRAP Y ORAC

ANTIOXIDANTES	Coeficiente de Correlación de Pearson (r)		
	ABTS (%)	FRAP (%)	ORAC (%)
Polifenoles totales	0.9962	0.8484	0.8484
Flavonoides totales	0.9842	0.7944	0.7944

Elaborado por: Loor, 2020

Perea *et al* [64] encontraron que existe una correlación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, pero estas variables se ven afectadas por el proceso de transformación del grano, especialmente durante la etapa de tostado, en la que se presenta una pérdida de polifenoles y de actividad antioxidante alrededor del 23% con respecto a la materia prima sin tratar. Para minimizar estos efectos, el proceso de extracción y manufactura deberá ser riguroso para conservar la calidad organoléptica y la actividad antioxidante [65], sobre todo, cuando el tostado se realice a temperatura superior a 120°C en la transformación industrial.

Según el trabajo de investigación realizado por Gültekin *et al.* [66], el contenido de polifenoles disminuye a medida que se realiza el proceso de beneficio del cacao de tal manera que su concentración disminuye en el siguiente orden: licor de cacao natural > grano de cacao sin tostar > grano de cacao tostado ≈ licor de cacao alcalinizado ≈ cacao en polvo > residuos.

A pesar de que el contenido de polifenoles totales de la cascarilla de cacao es menor que en las almendras y subproductos del cacao, está presenta una correlación positiva perfecta ($r^2 < 0,95$) y estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con la actividad antioxidante medida por el método de ABTS, indicando que los fitonutrientes presentes en estos residuos pueden actuar como agentes antioxidantes, cuya función biológica es atrapar radicales libres (RL) presentes en nuestro organismo.

Al evaluar el nivel de correlación del contenido fenólico con la actividad antioxidante medida por FRAP ($r^2=0,8484$) y ORAC ($r^2=0,8484$) es menor que la observada en ABTS ($r^2=0,9962$); sin embargo, esta es positiva moderada ($r^2=0,5$ a $0,95$). En el caso del contenido de flavonoides totales, estos siguen el mismo comportamiento que los polifenoles totales; mostrando una correlación positiva fuerte ($r^2=0,9842$) para el método de ABTS y positiva moderada para los métodos de FRAP ($r^2=0,7944$) y ORAC ($r^2=0,7944$).

Por lo tanto, los residuos de cacao pueden considerarse una fuente antioxidante muy poderosa, con un potencial interesante para la valorización de residuos de la industria chocolatera. Dichos componentes tienen la capacidad de reducir los compuestos metálicos, que en nuestro organismo pueden actuar como prooxidantes. Además de favorecer la acción de los compuestos antioxidantes, mediante la captación de radicales peroxilo, unas de las especies reactivas del oxígeno (ROS) responsables del daño de proteínas, ADN, ARN, entre otros

Cabe destacar la importancia de la valorización de estos residuos, ya que se basa en el uso de los desechos como un producto económico, rico en materiales orgánicos y fuente potencial de fitonutrientes [67] [68].

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

De acuerdo a lo observado, al final de la etapa de recolección, fermentación, secado y descascarillado, se obtuvo un rendimiento de 1.39% de cascarilla en la variedad Nacional y un 1.36% en la CCN-51.

Se comprobó que existe un efecto de la variedad sobre contenido fenólico de la cascarilla de cacao, las muestras presentaron un alto contenido de polifenoles y flavonoides totales en las muestras, existiendo mayor valor en la variedad CCN-51 (PT: 42.17 mg AGE•100g-1 y FT: 20.57 mg CAT•100g-1).en comparación a la nacional (PT: 29.43 mg AGE•100g-1 y FT:15.08 mg CAT•100g-1).

El análisis de correlación de Pearson demostró que existe una correlación positivamente perfecta (> 99%) entre la actividad antioxidante con el contenido de polifenoles y flavonoides totales en el método de ABTS⁺; en las dos variedades de cascarilla de cacao. Mientras que, en los métodos de FRAP y ORAC, la correlación es moderada ($r^2=0,5$ a 0,95%); demostrando que estos componentes son los responsables del valor biológico de las muestras estudiadas.

De acuerdo con el estudio de validación de métodos, la cascarilla de cacao puede valorizarse aplicando soluciones etanólicas como medio extractante (etanol/agua; 50/50; %v/v). Por lo que, para el proceso de microencapsulación debe emplearse el sobrenadante líquido en mezcla con el agente encapsulante (maltodextrina) para la conservación de los compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante; protegiéndolos de la luz y el oxígeno.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar investigaciones acerca del contenido fenólico de muestras de cascarilla de cacao de diferentes variedades, orígenes; así como de muestras comerciales.
- Evaluar el efecto del proceso de tostado en la disminución del contenido fenólico de la cascarilla de cacao
- Identificar el potencial spin-off de la cascarilla de cacao para la valorización integral de los residuos de la industria cacaotera para la obtención de subproductos con perfil nutricional e industrial.
- Realizar un estudio económico con la finalidad de establecer el costo de producción para la obtención de componentes bioactivos a partir de la cascarilla de cacao.
- Dentro de las posibles aplicaciones de la cascarilla de cacao, se sugiere el aprovechamiento de este residuo en el desarrollo de productos de confitería carentes de propiedades antioxidantes como los sucedáneos de chocolate (chocolate blanco), con la finalidad de disminuir el impacto negativo en el organismo, por el consumo de alimentos con alto contenido de azúcar y grasa.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía consultada.

- [1] I. Murillo y M. Quilambaqui, «Evaluación de 2 dietas experimentales con diferentes niveles de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) en las fases de crecimiento y acabado de cuyes (*Cavia porcellus* L.) de raza andina,» 2008.
- [2] E. Vivanco, L. Matute y M. Campo, «Caracterización físico-química de la cascarilla de *Theobroma cacao* L, variedades Nacional y CCN-51,» *Conference Proceedings UTMACH*, vol. 2, n° 1, Diciembre 2017.
- [3] J. Sánchez, «Evaluación energética de cáscaras de cacao nacional y ccn-51,» Cuenca, 2013.
- [4] A. Zambrano, «El cacao Ecuatoriano: un producto de consumo creciente,» *Revista El Agro*, 2016.
- [5] P. Maisuthisakul y M. H. Gordon, «Antioxidant and tyrosinase inhibitory,» *Food Chemistry*, vol. 2, n° 117, pp. 332-341, 2009.
- [6] A. Serena y K. Knudsen, «Chemical and physicochemical characterisation of coproducts from the vegetable food and agro industries,» *Animal feed science and technology*, vol. 1, n° 139, pp. 109-124, 2007.
- [7] T. Misnawi, E. Susijahadi y A. Noor, «The utilization of cocoa polyphenol extract to improve the shelf life of bulk frying oil used in open and deep frying,» *International food research journal*, vol. 21, pp. 111-118, 2014.
- [8] K. Alvarez y F. Quilumba, «Aprovechamiento de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la elaboración de polvo y sus usos culinarios,» Guayaquil, 2018.
- [9] International Cocoa Organization, «Products that can be made from cocoa,» 2003. [En línea]. Available: <http://www.icco.org/faq/52-by-products/115-products-that-can-be-made-from-cocoa.html>.

- [10] C. Cabrera, «Niveles de jugo de naranja (*Citrus Aurantium L.*), como antioxidante natural en la elaboración de tilapia ahumada,» Quevedo, 2012.
- [11] E. Pastene, «Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante,» *Boletín Latinoamericano del Caribe: Plantas Medicinales Aromáticas*, vol. 8, nº 6, pp. 449-455, 2009.
- [12] G. Enriquez, «Manual de Cacao Orgánico: guía para productores Ecuatorianos. Manual numero 54,» Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito, 2001.
- [13] L. Ayeni, «Efecto de la asociacion de la ceniza de mazorca del cacao y NPK fertilizante en propiedades del suelo, absorcion de nutrientes y rendiemento del maiz (*Zea mays*),» *Revista de Ciencias Americanas*, pp. 79-84, 2010.
- [14] F. Padilla, A. Rincon y L. Bou-Rached, «Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces,» *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, vol. 58, nº 3, pp. 84-102, 2008.
- [15] I. Ignat, I. Volf y V. Popa, «A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables,» *Food Chemistry*, vol. 126, nº 4, pp. 1821-1835, 2011.
- [16] O. García, R. Benito y C. Rivera, «Hacia una definición de Fibra Alimentaria,» *Nutrición*, vol. 25, nº 1, pp. 25-30, 2008.
- [17] J. Nicolás y M. Weigend, «Hoja botánica: Cacao (*Theobroma cacao L.*),» Lima, 2012.
- [18] M. Acebo-Plaza, «Industria de Cacao,» 2016.
- [19] Anecacao, «Sector exportador de Cacao 2019,» Asociación Nacional de Exportadores de Cacao, 2019.
- [20] Corporación Financiera Nacional, «Ficha Sectorial: Cacao y chocolate,» GDGE – Subgerencia de análisis e información , 2018.

- [21] C. Tapia-Yáñez, «Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) variedad arriba y ccn51 para la elaboración de una infusión,» Ambato, 2015.
- [22] S. T. Becket, «Science of Chocolate,» The Royal Society of Chemistry, Cambridge-Reino Unido, 2008.
- [23] I. H. De La Mota, El libro del chocolate, Madrid Editorial Pirámide, 2007, pp. 26, 87.
- [24] T. Winkel, «Ecuador and cacao: an old alliance. A peace corps masters international project,» 2013.
- [25] A. Saltos, V. Sánchez y A. Anzules, «Beneficio del cacao,» Taller de entrenamiento en calidad física y organoléptica de cacao (20 – 24 de marzo / 2006, Quevedo-Ecuador) , Quevedo, 2006.
- [26] N. Rodríguez de Sindoni, «Beneficio del cacao (Theobroma cacao L.),» 2006.
- [27] INEN, «NTE INEN 176:2006. Cacao en grano. Requisitos,» INEN, Quito, 2006.
- [28] D. Boskou, M. Tsimidou y G. Blekas, «Olive oil: chemistry and technology. Polar phenolic compounds. Aristotle university of Thessaloniki,» 2006.
- [29] C. Espinosa-Escobar y D. Mosquera-Narváez, «Estudio de factibilidad para la producción de cacao en el cantón San Lorenzo, provincia de Esmeraldas,» Quito, 2012.
- [30] M. Rodríguez, N. Motato, O. Zambrano y C. Tarquino, «Manejo técnico del cultivo de cacao en Manabí,» Manabí, 2010.
- [31] M. Guerrero-Cabrera, «Diagnóstico y propuesta de parámetros para la estandarización y homogenización del tratamiento poscosecha de cacao,» Lima, 2007.
- [32] Y. Suazo, «Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaraguense,» Navarra, 2012.

- [33] P. Paz-Jiménez, «Utilización de tres niveles de cascarilla de cacao (5, 10 y 15 %) en la alimentación de conejos mestizos durante el crecimiento y engorde,» Quevedo, 2012.
- [34] M. Coronado, «Antioxidantes: perspectiva actual,» *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 42, n° 2, pp. 54-55, Junio 2015.
- [35] J. Sánchez, «Cascarilla de cacao,» 2012. [En línea]. Available: <http://moliendadeharinasyespecias.com/productos/cascarilla-de-cacao.html>. p 2, 3..
- [36] J. Nsoratindana, Z. Fang, J. Kebitsamang, M. Lamine y I. Camel, «Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.),» *Pakistan journal of nutrition.*, vol. 11, n° 7, pp. 574-579, 2012.
- [37] M. Tolentino, «Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de la cascarilla de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) Tostado y elaboración de un filtrante,» Tingo María, 2014.
- [38] V. Ovaco y L. Pineda, «Los residuos de cacao (*Theobroma cacao* L) como fuente alternativa de antioxidante,» Loja, 2011.
- [39] J. Wollgast y E. Anklam, «Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification,» *Food Res Int*, pp. 423-447, 2000.
- [40] A. Scalbert y G. Williamson, «Dietary intake and bioavailability of polyphenols,» *Journal of Nutrition*, vol. 130, pp. 2109-2114, 2000.
- [41] S. Toro, M. R. Estupiñan y L. J. López, «Cocoa husk as source of natural phenolic antioxidants: comparison of polyphenols and antioxidant activity in *theobroma cacao* beans and husk,» Medellín, 2014.
- [42] S. Zapata, A. Tamayo y A. Rojano, «Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. Revista Cubana de Plantas Medicinales,» *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 18, n° 3, pp. 391-404, 2013.

- [43] N. Niemenak, C. Rohsiusb, S. Elwersb, D. O. Ndoumoua y L. R., «Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents,» *J Food Composition Analysis*, vol. 198, pp. 612-619, 2006.
- [44] P. Martínez, *Manual básico de investigación científica.*, México;: El Manual Moderno., 2011.
- [45] S. Espín y I. Samaniego, *Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao*, Quito, 2016..
- [46] W. Llerena, «Efecto de la aplicación de atmósferas modificadas en la capacidad antioxidante de arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.),» Panplona, 2018.
- [47] C. Quinaluisa, *Microencapsulación de componentes bioactivos de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*) mediante secado por aspersión.*, Ambato; Ecuador: Universidad Técnica de Ambato;, 2018.
- [48] I. Samaniego, S. Espín, J. Quiroz, B. C. W. Ortiz, C. García-Viguera y P. Mena, «Efecto del área de cultivo sobre el contenido de metilxantinas y flavan-3-oles en granos de cacao de Ecuador,» *Revista de composición y análisis de alimentos*, vol. 88, 2020.
- [49] J. Żebrowska, M. Dyduch-Siemińska, J. Gawroński y I. Jackowska, «The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals,» *Food Chemistry*, vol. 64, n° 4, pp. 555-559, 1999.
- [50] S. Sandoval, «Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos,» Instituto de Salud Pública Chile, Santiago de Chile, 2010.
- [51] A. Karadag, B. Ozcelik y S. Saner, «Review of methods to determine antioxidant capacities,» *Food Anal Methods*, vol. 2, n° 1, pp. 41-60, Marzo 2009.

- [52] R. Martínez, P. Torres, M. A. Meneses y J. G. Figueroa, «Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products,» *Food Res Int*, vol. 9, nº 1, pp. 39-45, Noviembre 2012.
- [53] S. Manzutti, L. Gonçalves y N. Mezzomo, «Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls,» *J. Supercrit Fluids*, vol. 135, pp. 52-59, Diciembre 2018.
- [54] W. Gavica-Contreras, «Validación de la determinación de los ácidos fenólicos presente en la infusión de cascarilla de la semilla de cacao (*Theobroma cacao*) por el equipo de electroforesis capilar,» Guayaquil, 2016.
- [55] K. Tkacz, A. Wojdyło, P. Nowicka, I. Turkiewicz y G. T., «Characterization in vitro potency of biological active fractions of seeds, skins and flesh from selected *Vitis vinifera* L. cultivars and interspecific hybrids.,» *J Funct Foods*, vol. 53, pp. 353-363, 2019.
- [56] R. Campos-Vega, K. H. Nieto-Figueroa y D. OomahB., «Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Vol. 81, Trends in Food Science and Technology,» vol. 81, pp. 172-184, 2018.
- [57] USDA, «U.S. Department of Agriculture,» 4 Enero 2019. [En línea]. Available: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/391697/nutrients>.
- [58] Z. S. Vásquez, D. P. de Carvalho Neto, G. Pereira, L. Vandenberghe, P. Z. de Oliveira y P. Tiburcio, «Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review,» *Waste ManagEMENT*, pp. 72-83, 2019.
- [59] A. Ramos, L. Garcia, M. Pinedo y R. E. Souza, «Evaluación de factores de procesamiento y conservación de pulpa de *Myrciaria Dubia* H.B.K. (Camu-Camu) que reducen el contenido de vitamina C (Ácido Ascórbico),» *Revista Amazónica de investigación*, vol. 2, nº 2, pp. 89-99, 2002.

- [60] P. Santos y M. Silva, «Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables,» *Drying Technology*, vol. 26, pp. 1421-1437, 2008.
- [61] C. Sigcha-Vera y Z. M. Alejandra, «Mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L .) en la obtención de alcohol etílico,» Santo Domingo, 2018.
- [62] V. L. R. D. Edraiyani y M. V. Karwe, «Total Phenolics and Antioxidant Capacity of Cocoa Pulp: Processing and Storage Study,» *J Food Process Preserv*, vol. 41, n° 4, pp. 1-6, 2016.
- [63] L. Sotelo, A. Alvis y G. Arrazola, «Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante,» *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, vol. 9, n° 1, pp. 124-134, Enero-Julio 2015.
- [64] J. Perea, T. Cadena y J. Herrera, «El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento,» *Revista de la Universidad Industrial de Santander*, vol. 41, n° 2, pp. 128-134, 2009.
- [65] M. Arlorio, «Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans,» *Food Chemistry*, vol. 106, n° 3, pp. 967-975, 2007.
- [66] M. Gültekin-Özgüven, B. Ijlal y Ö. Beraat, «Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans,» *LWT - Food Science and Technology*, vol. 72, pp. 559-565, 2016.
- [67] A. Tovar, L. Godinez, F. Espejel y R. Ramírez, «Optimization of the integral valorization process for orange peel waste using a design of experiments approach: Production of high-quality pectin and activated carbon,» *Waste Management*, n° 85, pp. 202-213, 2019.
- [68] M. Kazemi, F. Khodayin, S. S. Hosseini y Z. Najari, «An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan,» *Waste Management*, n° 100, pp. 101-111, 2019.

- [69] G. Chiva y F. Visioli, «Polyphenols and health: moving beyond antioxidants,» *J Berry Res*, vol. 2, pp. 63-71, 2012.
- [70] J. J. Aguirre, T. H. De La Garza, C. A. Zugasti, C. R. Belmares y C. N. Aguilar, «The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology,» *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 3, n° 6, pp. 436-442, 2013.
- [71] F. Perez, J. Duarte, R. Jimenez, C. Santos y A. Osuna, «Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin,» *Pharmacol Rep*, vol. 61, pp. 67-75, 2009.
- [72] Diario El Campesino, «Residuos del cacao: otra fuente de ingresos para los campesinos,» 23 Julio 2018. [En línea]. Available: <https://www.elcampesino.co/residuos-del-cacao-una-nueva-alternativa-de-produccion/>.
- [73] J. Gavilanes, «Evaluación de la absorción y desorción en la testa de cacao (*Theobroma cacao* L.) adicionada con miel de caña para la obtención de un producto alimentario,» Quevedo, 2015.
- [74] D. L. Roza, «Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao del *Theobroma cacao* L., subproducto de una industria chocolatera nacional,» Pereira, 2014.
- [75] C. Párraga, «Calidad física y organoléptica de las almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante métodos de fermentación y estaciones climáticas,» Calceta, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 Evidencias fotográficas del proceso

Recolección de las muestras



Pesado



Etapa de fermentación



Proceso de secado



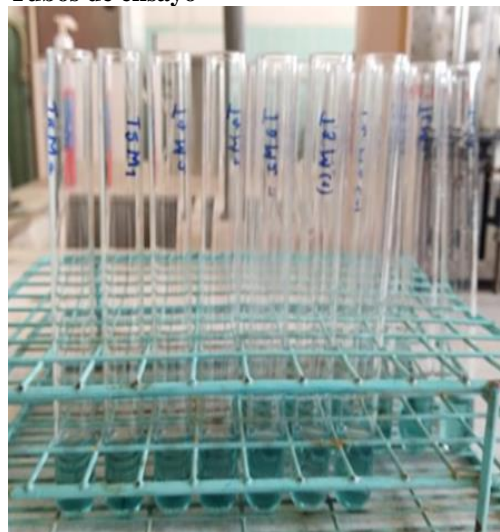
Descascarillador



Muestras de cascarilla



Tubos de ensayo



Cuantificación de la actividad antioxidante mediante espectrofotometría UV-VIS



Anexo 2 Datos obtenidos para el cálculo del índice de rendimiento de cascarilla de cacao Nacional y CNN-51.

Peso en gramos Cacao Nacional								
Muestra	N granos	Peso mazorca	Cáscara	Placenta	Mucilago	Almendra	Cascarilla	Almendra descascarillada
1	53	503.00	381.00	7.00	32.00	83.00	8.00	75.00
2	46	527.00	384.00	8.20	33.30	101.50	5.60	95.90
3	51	373.00	289.00	7.70	31.90	44.40	5.70	38.70
4	45	482.00	329.00	7.90	29.90	115.20	5.60	109.60
5	51	356.00	283.00	5.80	29.00	38.20	5.80	32.40
6	56	416.00	302.00	4.40	28.00	81.60	6.10	75.50
7	50	447.00	315.00	8.20	31.20	92.60	5.90	86.70
8	49	430.00	307.00	9.10	33.70	80.20	5.80	74.40
9	54	498.00	382.00	6.60	32.40	77.00	5.90	71.10
10	50	386.00	299.00	6.70	30.50	49.80	6.90	42.90
Promedio	51	441.80	327.10	7.16	31.19	76.35	6.13	70.22
Porcentaje %		100.00	74.04	1.62	7.06	17.28	1.39	15.89

Peso en gramos Cacao CCN-51								
Muestra	N granos	Peso mazorca	Cáscara	Placenta	Mucilago	Almendra	Cascarilla	Almendra descascarillada
1	53	501.00	311.00	7.00	34.00	149.00	6.00	143.00
2	46	480.00	304.00	8.20	35.00	132.80	6.60	126.20
3	51	424.40	305.50	7.70	37.70	73.50	7.10	66.40
4	45	401.70	309.00	7.90	30.00	54.80	5.00	49.80
5	51	406.60	301.00	5.80	38.50	61.30	5.60	55.70
6	56	416.00	312.00	4.40	29.90	69.70	6.00	63.70
7	50	447.00	302.20	8.20	33.00	103.60	6.00	97.60
8	49	430.00	299.00	9.10	33.00	88.90	5.80	83.10
9	54	498.00	302.00	6.60	30.00	159.40	6.00	153.40
10	50	386.00	302.30	6.70	34.30	42.70	5.60	37.10
Promedio	51	439.07	304.80	7.16	33.54	93.57	5.97	87.60
Porcentaje %		7317.83	69.42	1.63	7.64	21.31	1.36	19.95

Anexo 3 Árbol de problemas de la investigación.

