



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

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

Título del Proyecto de Investigación.

“IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE POLIFENOLES, FLAVONOIDES Y
METILXANTINAS EN MAZORCA Y PLACENTA DE CACAO (*Theobroma cacao*, L.)
DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL”.

Autora

Chuez Sabando Katherine Pamela

Directora del Proyecto de Investigación

Ing. Llerena Silva Wilma Maribel, MSc.

Codirector del Proyecto de Investigación

Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua, PhD.

Quevedo - Los Ríos - Ecuador

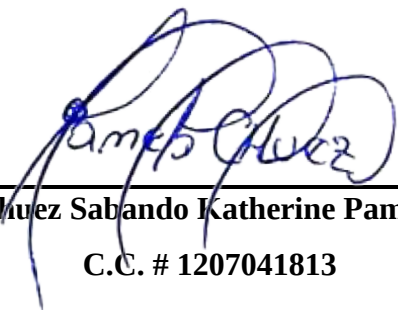
2022



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

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

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

f. 
Chuez Sabando Katherine Pamela
C.C. # 1207041813



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc. Docente de la Facultad de Ciencias de la Industria y Producción de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, y el Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD. Director de la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP).

CERTIFICAN que la estudiante Chuez Sabando Katherine Pamela, ha realizado el Proyecto de Investigación **titulado “IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE POLIFENOLES, FLAVONOIDES Y METILXANTINAS EN MAZORCA Y PLACENTA DE CACAO (*Theobroma cacao*, L.) DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL”**, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, bajo nuestra dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.



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

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.
**DIRECTORA DEL PROYECTO
DE INVESTIGACIÓN**



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

Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD.
**CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DE INVESTIGACIÓN**



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

Dado el 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 SENECYT, la suscrita Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc. y el Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD., en calidad de Directores del Proyecto de Investigación titulado **“IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE POLIFENOLES, FLAVONOIDES Y METILXANTINAS EN MAZORCA Y PLACENTA DE CACAO (*Theobroma cacao*, L.) DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL”**, de autoría de la estudiante Chuez Sabando Katherine Pamela, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es del **3%** el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Document Information

Analyzed document	V1. Chuez Katherine-21-NOV.pdf (D150508055)
Submitted	11/22/2022 4:14:00 AM
Submitted by	
Submitter email	katherine.chuez2016@uteq.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	wllerenas.uteq@analysis.orkund.com



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

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.
**DIRECTORA DEL PROYECTO
DE INVESTIGACIÓN**



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

Dr. Iván Samaniego Maigua, PhD.
**CO-DIRECTOR DEL PROYECTO
DE INVESTIGACIÓN**



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

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título

**“IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE POLIFENOLES,
FLAVONOIDES Y METILXANTINAS EN MAZORCA Y PLACENTA
DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y
NACIONAL”**

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

Aprobado por:



Firmado electrónicamente por:
**CHRISTIAN
AMABLE VALLEJO
TORRES**

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Christian Amable Vallejo Torres, MSc



Firmado electrónicamente por:
**VICENTE ALBERTO
GUERRÓN TROYA**

MIEMBRO DE TRIBUNAL.
Ing. Vicente Guerrón Troya, MSc



Firmado electrónicamente por:
**LEONILO ALFONSO
DURAZNO DELGADO**

MIEMBRO DE TRIBUNAL
Ing. Leonilo Durazno Delgado, MSc

QUEVEDO - LOS RÍOS – ECUADOR
2022

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por guiar mi camino y permitirme concluir con mis estudios universitarios.

Quiero darle gracias a mi familia, especialmente a mis padres Wellington Chuez Cedeño y Judith Sabando Mendoza, quienes me dieron la vida, su cariño y su apoyo en todo momento, asimismo quiero agradecerle a mi hermano David Chuez Sabando, que durante todos estos años ha sido un amigo y compañero, quien me brinda su confianza y afecto cada día.

De igual manera, quiero agradecer a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a la Carrera de Ingeniería en Alimentos, por brindarme el conocimiento a través de todos y cada uno de los docentes que ha contribuido en mi formación profesional.

También quiero dar gracias a la Asociación “La Cruz” por las facilidades brindadas para la recolección y postcosecha del cacao. Así mismo agradezco a la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP), que brindo las facilidades para el desarrollo de la fase experimental del proyecto de investigación, en las instalaciones del Departamento de Nutrición y Calidad, bajo la coordinación del Dr. Iván Samaniego, PhD., que gracias a su experiencia se pudo llevar a cabo esta investigación.

Finalmente, quiero agradecer a mi tutora Wilma Llerena, MSc., quien desde un principio me brindo su amistad, confianza, conocimientos y sobre todo experiencia.

Katherine Chuez Sabando.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado a Dios, por permitir llegar a este punto y alcanzar uno de los objetivos más deseados.

A mis padres Wellington Chuez y Judith Sabando quienes, con su apoyo incondicional, paciencia y esfuerzo, he logrado culminar este proceso anhelado, porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento incentivaron una mejor versión de mí, y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mi hermano David Chuez S., que siempre con su carisma estuvo acompañándome en mis tareas y cuidándome en todo momento.

A la Universidad, por impartir conocimientos que me ayudaran en un futuro. También a las amistades que formaron parte de mi vida Zharet, Mafer, Karina, Gissela, Mayito, Pamela y Heydi., y a quiénes un día me brindaron su apoyo emocional Laura y Jumayra, les agradezco por demostrarme que aún existe la lealtad.

Katherine Chuez Sabando.

RESÚMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

En la presente investigación se identificó el perfil fenólico y alcalino de muestras residuales de mazorca y placenta de cacao de la variedad NacionalxTrinitario y Clon de CCN-51, las cuales fueron extraídas de la Asociación de Agricultores “La Cruz” del cantón Mocache perteneciente a la Provincia de Los Ríos, Ecuador. Dentro del perfil de polifenoles se determinaron los compuestos fenólicos mediante la técnica de HPLC; empleando estándares de Catequina, Epicatequina, Procianidina B₁, B₂ y C₁. En el mismo perfil se encontraron polifenoles de origen no identificado en las muestras residuales, cuyas concentraciones se denominan de la siguiente manera. En la placenta se encontró Ácido-4 hidroxibenzoico ($45,9678 \pm 25,41$ a $10,028 \pm 25,41 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Ácido Vanillico ($4,087 \pm 2,89$ a $0 \pm 2,89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Ácido Cumarico ($0,875 \pm 0,36$ a $0,361 \pm 0,36 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Ácido Cafeico ($0,606 \pm 0,97$ a $1,985 \pm 0,97 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) y Ácido Transferúlico ($2,076 \pm 1,31$ a $0,219 \pm 1,31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). A diferencia de la mazorca que se encontró mayor cantidad de compuesto como Ácido-4 hidroxibenzoico ($3,796 \pm 0,12$ a $3,967 \pm 0,12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Ácido Cumarico ($1,985 \pm 0,04$ a $2,048 \pm 0,04 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Ácido Cafeico ($38,975 \pm 11,86$ a $22,201 \pm 11,86 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Ácido Transferúlico ($0,878 \pm 0,74$ a $1,927 \pm 0,74 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Catequina ($5,061 \pm 2,65$ a $8,812 \pm 2,65 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Epicatequina ($0 \pm 9,93$ a $14,056 \pm 9,93 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Por otra parte, en el perfil alcalino en muestras de placenta de cacao se identificaron compuestos, cuyas concentraciones fueron las siguientes, para Teobromina (5.66 ± 0.37 a $3.10 \pm 0.35 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) y para Cafeína ($5,10 \pm 0.08$ a $3,03 \pm 0.02 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). En la mazorca de cacao, el perfil de compuestos alcalinos presentó una concentración inferior con valores de ($2,60 \pm 0.04$ a $0.00 \pm 0.00 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) para Teobromina y (8.22 ± 1.41 a $4,01 \pm 0.79 \mu\text{g/g} \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) para Cafeína. A través del análisis de Correlación de Pearson demostró que la actividad antioxidante fue medida por ABTS y FRAP en el perfil fenólico fue de ($>79,17 \%$) indicando que es una correlación negativa débil. De igual manera, en el perfil alcalino la actividad antioxidante por ABTS y FRAP fue de ($>79,17 \%$) demostrando que es una correlación negativa débil.

Palabras claves: subproductos de cacao, 3-flavan-ols, metilxantinas de cacao, capacidad antioxidante, fitonutrientes.

ABSTRACT AND KEYWORDS

In the present investigation, the phenolic and alkaline profile of residual samples of cocoa pods and placenta of the NacionalxTrinitario variety and CCN-51 clone were identified, which were extracted from the "La Cruz" Farmers' Association of the Mocache canton belonging to the Province of Los Rios, Ecuador. Within the polyphenol profile, the phenolic compounds were determined using the HPLC technique; using standards of Catechin, Epicatechin, Procyanidin B1, B2 and C1. In the same profile, polyphenols of unidentified origin were found in the residual samples, whose concentrations are named as follows. In the placenta, 4-hydroxy benzoic acid ($45,9678 \pm 25,41$ to $10,028 \pm 25,41 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Vanillic acid ($4,087 \pm 2,89$ to $0 \pm 2,89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Coumaric Acid ($0,875 \pm 0,36$ to $0,361 \pm 0,36 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Caffeic Acid ($0,606 \pm 0,97$ to $1,985 \pm 0,97 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) and Transferulic Acid ($2,076 \pm 1,31$ to $0,219 \pm 1,31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Unlike the cob, which found a greater amount of compound such as 4-hydroxy benzoic acid ($3,796 \pm 0,12$ to $3,967 \pm 0,12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Coumaric Acid ($1,985 \pm 0,04$ to $2,048 \pm 0,04 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Caffeic Acid ($38,975 \pm 11,86$ to $22,201 \pm 11,86 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Transferulic Acid ($0,878 \pm 0,74$ to $1,927 \pm 0,74 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Catechin ($5,061 \pm 2,65$ to $8,812 \pm 2,65 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), Epicatechin ($0 \pm 9,93$ to $14,056 \pm 9,93 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). On the other hand, in the alkaline profile in cocoa placenta samples, compounds were identified, whose concentrations were as follows: for Theobromine (5.66 ± 0.37 to $3.10 \pm 0.35 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) and for Caffeine (5.10 ± 0.08 to $3.03 \pm 0.02 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). In the cocoa pod, the profile of alkaline compounds presented a lower concentration with values of (2.60 ± 0.04 to $0.00 \pm 0.00 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) for Theobromine and (8.22 ± 1.41 to $4.01 \pm 0.79 \mu\text{g/g mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) for Caffeine. Through the Pearson Correlation analysis, it was shown that the antioxidant activity was measured by ABTS and FRAP in the phenolic profile ($>79.17\%$), indicating that it is a weak negative correlation. Similarly, in the alkaline profile, the antioxidant activity by ABTS and FRAP was ($>79.17\%$), demonstrating that it is a weak negative correlation.

Keywords: cocoa by-products, 3-flavan-ols, cocoa methylxanthines, antioxidant capacity, phytonutrients.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESÚMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES	viii
ABSTRACT AND KEYWORDS	ix
TABLA DE CONTENIDO	x
CÓDIGO DUBLIN	xi
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.....	7
1.1.3. Sistematización del problema.....	7
1.2. Objetivos.....	7
1.2.1. Objetivo General.....	7
1.2.2. Objetivos Específicos.	7
1.3. Justificación.	8
CAPÍTULO II.....	9
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	9
2.1. Marco Conceptual.....	10

2.1.1.	Mazorca.	10
2.1.2.	Cáscara.....	10
2.1.3.	Placenta.....	10
2.1.4.	Cromatografía HPLC.....	11
2.1.5.	Compuestos bioactivos.	11
2.1.6.	Antioxidantes.....	11
2.1.7.	Fitonutrientes.	11
2.2.	Marco Referencial.....	12
2.2.1.	Origen del cacao.	12
2.2.2.	Cacao en el Ecuador.	12
2.2.3.	Producción de cacao en Ecuador.	13
2.2.4.	Variedades de cacao.	13
2.2.4.	Cadena de suministro del cacao.	15
2.2.5.	Manejo de Postcosecha de la cadena de valor del cacao.	20
2.2.6.	Residuos generados por la cadena de beneficio del cacao.	20
2.2.7.	Valorización de residuos de la industria alimentaria.....	24
2.2.8.	Biorrefinería (valorización de residuos).....	24
2.2.9.	Objetivos de desarrollo sostenible (ODS).	25
2.2.10.	Impacto ambiental.....	25
2.2.11.	Economía circular.	25
2.2.12.	Ecodiseño.....	26
2.2.13.	Cromatografía.	26
2.2.14.	Fuente de compuestos bioactivos.	26
2.2.15.	Compuestos Bioactivos.....	27
2.2.16.	Propiedades funcionales.	28
2.2.17.	Actividad antioxidante.....	28

2.2.18.	Capacidad Antioxidante.....	29
2.2.19.	Efecto de los compuestos bioactivos en la salud.	30
2.2.20.	Efecto benéfico en la salud.	30
2.2.21.	Efecto antiinflamatorio.	31
2.3.	Marco Referencial.....	32
2.4.	Marco Legal.....	34
2.4.1.	Objetivos de desarrollo sostenible (ODS).	34
2.4.2.	Sistema de gestión medioambiental (SGM) ISO 14001.....	34
CAPÍTULO III		35
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		35
3.1.	Localización.....	36
3.2.	Tipo de investigación.....	36
3.2.1.	Investigación descriptiva.	37
3.2.2.	Investigación exploratoria.	37
3.2.3.	Investigación experimental.....	37
3.3.	Método de investigación.	37
3.3.1.	Método inductivo-deductivo.	37
3.3.2.	Método estadístico.....	38
3.3.3.	Método experimental.....	38
3.4.	Fuente de recopilación de información.....	38
3.4.1.	Fuente Primaria.	38
3.4.2.	Fuente Secundaria.....	38
3.5.	Diseño de la investigación.	39
3.5.1.	Esquema de ANDEVA.....	40
3.5.2.	Análisis de correlación.	41
3.6.	Instrumento de investigación.....	41

3.6.1.	Muestreo.....	41
3.6.2.	Secado y liofilizado de la muestra de cacao.....	43
3.6.3.	Preparación de muestras.....	43
3.6.4.	Extracción de compuestos bioactivos.....	44
3.6.5.	Identificación de perfiles cromatográficos.....	45
3.7.	Tratamiento de los datos.....	46
3.7.1.	Variables.....	46
3.8.	Recursos humanos y materiales.....	47
3.8.1.	Recursos humanos.....	47
3.8.2.	Materiales.....	47
CAPÍTULO IV		46
RESULTADOS Y DISCUSIONES		46
4.	Resultados.....	51
4.1.	Perfil de polifenoles.....	51
4.1.1.	Adaptación de las condiciones del método.....	51
4.1.2.	Perfil cromatográfico.....	52
4.1.3.	Curva de calibración.....	52
4.1.4.	Cuantificación del perfil de polifenoles.....	54
4.1.5.	Cuantificación de polifenoles.....	57
4.2.	Perfil de metilxantinas.....	60
4.2.1.	Adaptación de las condiciones del método.....	60
4.2.2.	Perfil cromatográfico.....	61
4.2.3.	Curva de calibración.....	61
4.2.4.	Cuantificación del perfil de metilxantinas.....	62
4.2.5.	Cuantificación de metilxantinas.....	67
CAPÍTULO V		72

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	72
5.1. Conclusiones.....	73
5.2. Recomendaciones.	75
CAPÍTULO VI.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	76
6.1. Bibliografía.	77
CAPÍTULO VII.....	87
ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Diagrama de Ishikawa elaborado por el análisis de causa-efecto del problema considerado en este estudio.	5
Figura 2. Mazorca de cacao.....	10
Figura 3. Cáscara de cacao.	10
Figura 4. Placenta de cacao.	10
Figura 5. Origen del cacao.....	12
Figura 6. Cacao en Ecuador.....	12
Figura 7. Variedades de cacao.....	13
Figura 8. Cacao Nacional.	13
Figura 9. Cacao criollo.	14
Figura 10. Cacao forastero.	14
Figura 11. Cacao trinitario.....	14
Figura 12. Variedades del cacao CCN-51.	15
Figura 13. Cacao trinitario.....	15
Figura 14. Cadena de valor del cacao.....	16
Figura 15. Cosecha y procesamiento del cacao.....	16
Figura 16. Proceso de fermentación del cacao.	17
Figura 17. Fermentación.....	17
Figura 18. Fase Alcohólica.....	18

Figura 19. Fase Acética.	18
Figura 20. Fase de Oxidación del cacao.	19
Figura 21. Secado Natural.	19
Figura 22. Secado Artificial.	20
Figura 23. Composición de la mazorca de cacao.	21
Figura 24. Composición de la placenta de cacao.	23
Figura 25. Diagrama de procesos, postcosecha de cacao.	42
Figura 26. Curva de calibración promedio para la determinación del perfil de compuestos fenólicos por HPLC: PCN B1 (A), PCN B2 (B), PCN C1 (C), CAT(D), EPI (E).	53
Figura 27. Identificación del perfil de componentes fenólicos en placenta de cacao.	54
Figura 28. Identificación del perfil de componentes fenólicos en placenta de cacao por el método de estándar externo.	55
Figura 29. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao.	56
Figura 30. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao por el método de estándar externo.	56
Figura 31. Curva de calibración promedio para la determinación del perfil de compuestos alcalinos por HPLC: TEO (A), CAF (B).	56
Figura 32. Identificación del perfil de componentes alcalinos en placenta de cacao.	63
Figura 33. Identificación del perfil de componentes alcalinos en placenta de cacao por el método de estándar.	63
Figura 34. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao.	65
Figura 35. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao por el método estándar.	65

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Composición química y nutricional de la mazorca de cacao.	22
Tabla 2. Componentes de la placenta de cacao.	22
Tabla 3. Composición fisicoquímica de la placenta de cacao.	23
Tabla 4. Composición nutricional de la placenta de cacao.....	24
Tabla 5. Localización del trabajo experimental.....	36
Tabla 6. Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (mazorca y placenta).....	39
Tabla 7. Prueba de t-Student (dos muestras comparadas) para evaluar el efecto de la variedad de cacao (Clon de CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario) en el perfil fenólico de la mazorca y placenta de cacao.	40
Tabla 8. Matriz de correlación para relacionar el perfil fenólico (polifenoles y flavonoides) de la mazorca y placenta de cacao con la actividad antioxidante.....	41
Tabla 9. Condición cromatográfica para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía HPLC.....	51
Tabla 10. Concentraciones del perfil de componentes fenólicos de placenta de cacao.	57
Tabla 11. Concentraciones del perfil de componentes fenólicos de mazorca de cacao.	58
Tabla 12. Condicion cromatografica para la identificacion y cuantificacion de compuestos fenolicos por cromatografia HPLC.....	60
Tabla 13. Concentraciones del perfil de componentes alcalinos de placenta de cacao.....	67
Tabla 14. Concentraciones del perfil de componentes alcalinos de mazorca de cacao.....	68
Tabla 15. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas de placenta de cacao.	69
Tabla 16. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas de mazorca de cacao.	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Proceso de postcosecha y recolección de la muestra de variedades de cacao CCN-51 y Nacional.....	88
Anexo 2. Extracción de los polifenoles y flavonoides.	90
Anexo 3. Extracción de las metilxantinas.	92
Anexo 4. Datos obtenidos para calcular el índice de rendimiento de la mazorca y placenta de cacao Nacional y CCN-51.	94
Anexo 5. Resumen estadístico del Ácido-4 hidroxibenzoico, de la placenta de cacao.....	95
Anexo 6. Resumen estadístico del Ácido Vanillico, de la placenta de cacao.	95
Anexo 7. Resumen estadístico del Ácido Cumárico, de la placenta de cacao.	95
Anexo 8. Resumen estadístico del Ácido Cafeico, de la placenta de cacao.....	96
Anexo 9. Resumen estadístico del Ácido Transferúlico, de la placenta de cacao.	96
Anexo 10. Resumen estadístico del Ácido-4 hidroxibenzoico, de la mazorca de cacao. ..	96
Anexo 11. Resumen estadístico del Ácido Caféico, de la mazorca de cacao.	97
Anexo 12. Resumen estadístico del Ácido Cumárico, de la mazorca de cacao.....	97
Anexo 13. Resumen estadístico del Ácido Transferulico, de la mazorca de cacao.	97
Anexo 14. Resumen estadístico de Catequina, de la mazorca de cacao.	98
Anexo 15. Resumen estadístico de Epicatequina, de la mazorca de cacao.....	98

CÓDIGO DUBLIN

Título:	“IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE POLIFENOLES, FLAVONOIDES Y METILXANTINAS EN MAZORCA Y PLACENTA DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i>, L.) DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL”.
Autor:	Chuez Sabando Katherine Pamela
Palabra clave:	subproductos de cacao, 3-flavan-ols, metilxantinas de cacao, capacidad antioxidante, fitonutrientes.
Fecha de publicación:	
Editorial:	QUEVEDO, UTEQ, 2022
Resumen:	En la presenta investigación se identificó el perfil fenólico y alcalino de muestras residuales de mazorca y placenta de cacao de la variedad NacionalxTrinitario y Clon de CCN-51, las cuales fueron extraídas de la Asociación de Agricultores “La Cruz” del cantón Mocache perteneciente a la Provincia de Los Ríos, Ecuador. Dentro del perfil de polifenoles se determinaron los compuestos fenólicos mediante la técnica de HPLC; empleando estándares de Catequina, Epicatequina, Procianidina B₁, B₂ y C₁. En el mismo perfil se encontraron polifenoles de origen no identificado en las muestras residuales, cuyas concentraciones se denominan de la siguiente manera. En la placenta se encontró Ácido-4 hidroxibenzoico ($45,9678 \pm 25,41$ a $10,028 \pm 25,41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Ácido Vainillico ($4,087 \pm 2,89$ a $0 \pm 2,89 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Ácido Cumarico ($0,875 \pm 0,36$ a $0,361 \pm 0,36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Ácido Cafeico ($0,606 \pm 0,97$ a $1,985 \pm 0,97 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y Ácido Transferúlico ($2,076 \pm 1,31$ a $0,219 \pm 1,31 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). A diferencia de la mazorca que se encontró mayor cantidad de compuesto como Ácido-4 hidroxibenzoico ($3,796 \pm 0,12$ a $3,967 \pm 0,12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Ácido Cumarico ($1,985 \pm 0,04$ a $2,048 \pm 0,04 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Ácido Cafeico ($38,975 \pm 11,86$ a $22,201 \pm 11,86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Ácido Transferúlico ($0,878 \pm 0,74$ a $1,927 \pm 0,74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Catequina ($5,061 \pm 2,65$ a $8,812 \pm 2,65 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Epicatequina ($0 \pm 9,93$ a $14,056 \pm 9,93 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Por otra parte, en el perfil alcalino en muestras de placenta de cacao se identificaron compuestos, cuyas concentraciones fueron las siguientes, para Teobromina (5.66 ± 0.37 a $3.10 \pm 0.35 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) y para Cafeína ($5,10 \pm 0.08$ a $3,03 \pm 0.02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$). En la mazorca de cacao, el perfil de compuestos alcalinos presento una concentración inferior con valores de ($2,60 \pm 0.04$ a $0.00 \pm 0.00 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) para Teobromina y ($8.22 \pm 1.41$ a $4,01 \pm 0.79 \mu\text{g/g mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) para Cafeína. A través del análisis de Correlación de Pearson demostró que la actividad antioxidante fue medida por ABTS y FRAP en el perfil fenólico fue de ($>79,17\%$) indicando que es una correlación negativa débil. De igual manera, en el perfil alcalino la actividad antioxidante por ABTS y FRAP fue de ($>79,17\%$) demostrando que es una correlación negativa débil.
Descripción:	hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
Url:	

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie tropical nativa procedente de la familia *Sterculiaceae* que crece en las selvas húmedas del hemisferio occidental. Sus almendras constituyen un insumo básico en la industria chocolatera, confitería y repostería. Ecuador es el país que ocupa el cuarto lugar como exportador de cacao a nivel mundial, por ser el principal productor de grano fino de aroma; siendo de total agrado para el mercado extranjero. En el país se lo considera como un producto primario y de calidad, sin embargo, cumple un rol de gran importancia a nivel económico e histórico [1].

En la postcosecha, la almendra requiere de una serie de procesos donde existe la posibilidad de degradar compuestos poli-fenólicos, reduciendo sabores amargos, que son de preferencia para los consumidores, pero también reduce la disponibilidad de compuestos que son responsables de las funciones bioactivas beneficiosas [2].

Los residuos en la producción cacaotera, siendo un sector que genera un volumen significativo de residuos agroindustriales, los cuales son descartados directamente al suelo como vainas, cáscaras, pulpa y cascarilla. Este subproducto siendo un desperdicio representa una fuente renovable de compuestos bioactivos y contenido de fitoquímicos como, aminoácidos, polifenoles, enzimas, azúcares, minerales, etc., [3].

La industria del cacao es un sector crítico con mayor desafío para el desarrollo sostenible, donde la cáscara representa el 67-76%, dentro la misma se compone por celulosa (26%), lignina (24%), hemicelulosa (9%) y pectina (2%), entre otros. La manteca de cacao, se compone del 52-56%, en el germen 3-5%, considerando los ácidos grasos y aminoácidos, es una buena fuente de micronutrientes, incluidos magnesio y hierro, que también pueden afectar salud humana [4].

Actualmente, existe una gran demanda de alimentos ricos en compuestos bioactivos, por lo que es de vital importancia para el sector productivo ecuatoriano encontrar alternativas de bajo costo que permitan obtener compuestos con propiedades benéficas para la salud [5]. En los últimos años, se ha empezado a desarrollar estudios que tienen la finalidad de aprovechar residuos biológicos agroindustriales bajo el concepto de biorrefinería a través de la obtención de biocombustibles y bio-productos con alto valor agregado [3].

Los compuestos poli-fenólicos y metilxantinas son componentes antioxidantes que contribuyen al sabor amargo, dulce o astringente de los productos, que al ser consumidos generan una variedad de actividades beneficiosas como anticancerígena, antiinflamatoria y antidiabética, constituyendo un grupo de diversos de bioactivos, en matrices alimentarias como el cacao predominan flavonoides como: catequinas (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%) [6, 7]. De acuerdo con diferentes estudios, los residuos de cacao de la mazorca y placenta presentan un perfil de compuestos similar a las almendras, siendo ricos en compuestos fenólicos como: Proantocianidinas (58%), flavan-3-ols monómeros (+) catequina, CAT Y (-) epicatequina, ERI, (37%) y antocianinas (4%), carece de vitamina C, estas concentraciones son menores comparación a la almendra de cacao [8].

En el grafico1 del diagrama de Ishikawa, expresa los problemas de causa y efecto que existen en la actualidad debido al desperdicio que generan estos restos agroindustriales que al ser expulsados ocasionando gran perjuicio a la sociedad, por lo que parte de estos residuos conlleva a la contaminación tanto en Ecuador como en el mundo.

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo identificar el perfil fenólico y metilxantinas, en dos variedades de cacao Complejo NacionalxTrinitario y Clon de CCN-51, ampliamente cultivadas y comercializadas con la finalidad de obtener compuestos de alto valor biológico y de bajo costo.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

En el sector cacaotero, el problema se genera debido al no realizar un manejo residual adecuado, de tal manera que, en la fase de postcosecha este fruto produce restos como la cascara, mazorca, placenta, mucilago, entre otros más, que no tienen un debido aprovechamiento óptimo dentro del nivel industrial o productivo por ende, existe el desconocimiento en los productores de no saber aprovechar estos residuos, sin tener que desechar estos compuestos directamente al suelo, provocando una proliferación y contaminación al dejar estos restos a la intemperie [\[9, 10\]](#). El análisis de la causa-efecto de los escasos estudios de identificación de compuestos de alto valor biológico en mazorca y placenta de cacao ecuatoriano, se visualizan en el siguiente diagrama de Ishikawa (Figura 1).

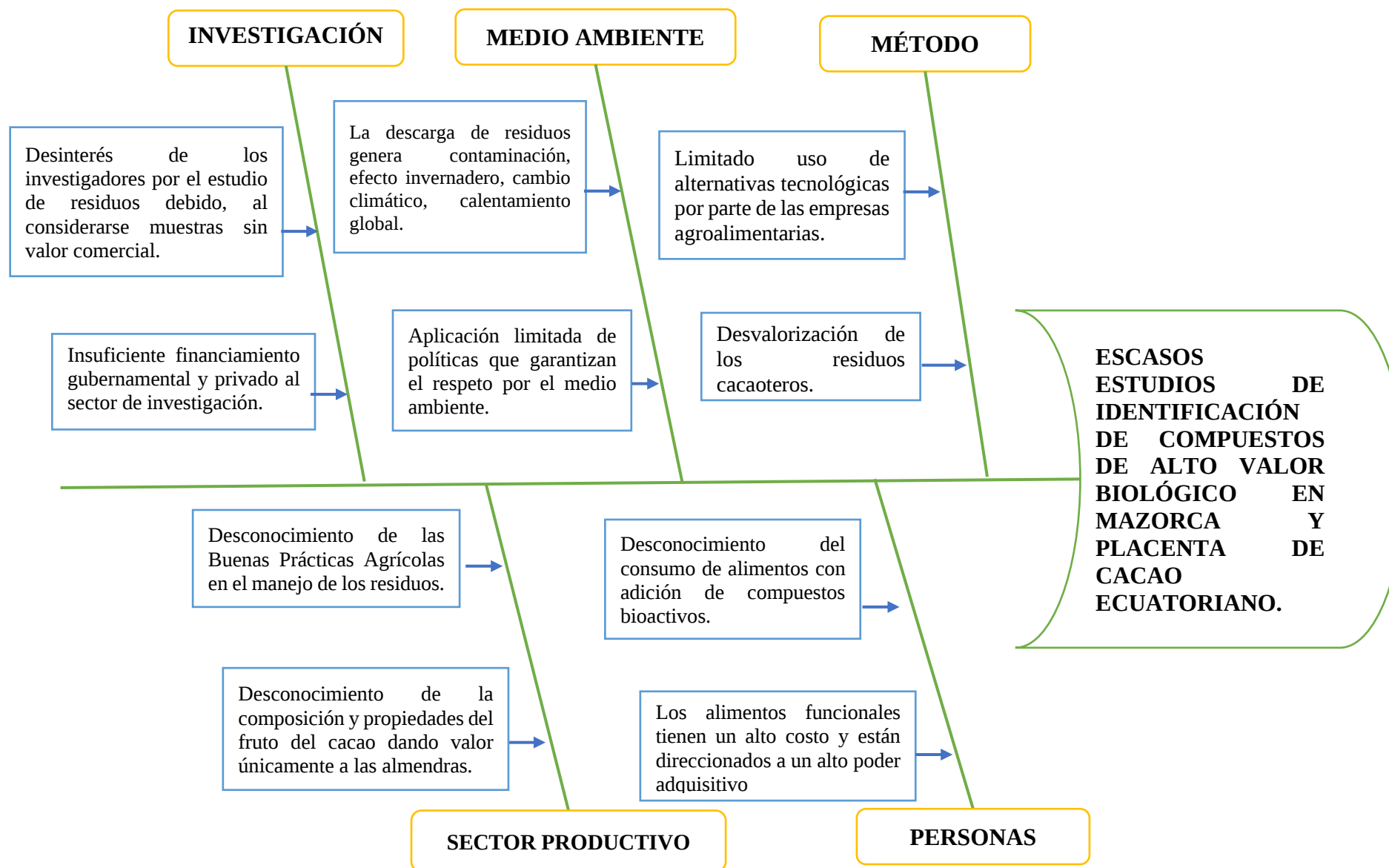


Figura 1. Diagrama de Ishikawa elaborado por el análisis de causa-efecto del problema considerado en este estudio.

Elaborado por: Chuez Katherine, 2022

1.1.1.1.Diagnóstico.

Los residuos agroindustriales generados durante el proceso de la postcosecha e industrialización del cacao, constituyen un problema ambiental donde repercute a la cantidad de desechos provenientes del cacao: mazorca, placenta, mucílago. Por ende, estos residuos que son descartados en el campo los mismo que llegan a acumular y fermentar creando un medio de cultivo de patógenos debido al lixiviado que desciende del mismo, convirtiéndolo en un foco de contaminación.

Hoy en día Ecuador es uno de los países donde la investigación basada en los residuos de origen agrícolas es escasa, debido a la falta de tecnología para la industrialización de los compuestos bioactivos, lo que genera un desinterés de las empresas agroalimentarias por invertir en desempeño sin residuos. política, prefiriendo disponer de ellos en vertederos o sobre el suelo. Por lo que esto hace, que en nuestro país se sume a la limitada cantidad de investigación científica y al escaso desarrollo de proyectos de inversión para el aprovechamiento de la biomasa [11].

El sector cacaotero, los residuos del cacao (mazorca y placenta) pueden ser aprovechados por medio de un proceso de extracción de sus fitonutrientes como los compuestos fenólicos (polifenoles, flavonoide y metilxantinas) siendo de gran utilidad para el desarrollo de nuevos productos alimenticios y funcionales dándoles un valor agregado a productos elaborados a base de una valorización residual.

1.1.1.2.Pronóstico.

Al no valorizar los residuos del cacao (mazorca y placenta), los mismos continuarán acumulándose en las zonas cacaoteras productoras del país que luego serán expulsados al entorno. Generando un deterioro y desprendiendo fluidos (lixiviado) los cuales contiene bacterias acéticas y lácticas, donde se reproducción de inmediato, creando olores fétidos atrayendo a las plagas. Sin embargo, estos residuos son responsables del bajo rendimiento y pérdidas económicas en el sector cacaotero, puesto que, elevan el riesgo de contaminación por hongos y enfermedades al cultivo de cacao.

1.1.2. Formulación del problema.

¿El perfil de polifenoles, flavonoides y metilxantinas de la mazorca y placenta de cacao de las variedades Nacional y CCN-51, mostró propiedades funcionales, actividad antioxidante y compuestos bioactivos?

1.1.3. Sistematización del problema.

¿Qué polifenoles se van a identificar por el método de HPLC en la mazorca y placenta de cacao Nacional y CCN-51?

¿Qué alcaloides se encuentran presentes en la mazorca y placenta de cacao?

¿Qué método emplearía para extraer los polifenoles, flavonoides y metilxantinas de la mazorca y placenta de cacao Nacional y CCN-51?

¿Cuál es la concentración de los perfiles polifenoles, flavonoides y metilxantinas en los residuos de cacao Nacional y CCN-51?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

- Identificar el perfil de polifenoles, flavonoides y metilxantinas en mazorca y placenta de cacao (*Theobroma cacao L.*) de las variedades de Clon CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario.

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Identificar el perfil de compuestos fenólicos y perfil de metilxantinas en mazorca y placenta de cacao
- Evaluar el efecto de la variedad en el perfil de compuestos bioactivos y metilxantinas en mazorca y placenta de cacao.
- Relacionar el contenido fenólico y el contenido de metilxantinas con la actividad antioxidante de mazorca y placenta de cacao.

1.3. Justificación.

Actualmente en Ecuador, existe una limitada información respecto al estudio de compuestos bioactivos presentes en los residuos agroindustriales, en el caso del sector cacaotero se cuenta con muy poca información acerca de la composición de la mazorca y placenta de cacao. Este desconocimiento conlleva a que no se dé un tratamiento adecuado a estos residuos. Por lo que, se los elimina directamente en el campo provocando la contaminación de ríos, suelos y aire. Así también son responsable de la propagación de plagas, enfermedades disminuyendo la calidad y el rendimiento de producción en las explotaciones cacaoteras.

El desarrollo de esta investigación se plantea con el fin de aprovechar los residuos de la cadena de beneficio del cacao, como mazorca y placenta, procedentes de centros de acopio, fincas y asociaciones agropecuarias, mediante el estudio del perfil de compuestos bioactivos presentes en estos subproductos y sus posibles aplicaciones en la industria alimentaria. La presencia de fitonutrientes como polifenoles, metilxantinas y flavonoides permitirán aportarle un valor agregado a esta biomasa que actualmente se considera un desecho sin valor comercial. Por otro lado, el uso de desechos orgánicos permitirá disminuir la contaminación ambiental generando un ingreso facultativo para muchos agricultores.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual.

2.1.1. Mazorca.



Figura 2. Mazorca de cacao.

La mazorca del cacao, representa aproximadamente el 75% total del peso del fruto, el cual está compuesto por él; epicarpio, mesocarpio, parte esclerótica y endocarpio. En cuanto a la composición la mazorca se compone de celulosa con el 20,8%, hemicelulosa con el 7%, lignina con el 13,2% y pectina con el 10,5% [12].

2.1.2. Cáscara.

La cascara de cacao es la parte gruesa externa, no consumible y comúnmente desperdiciados por industrias y productores cacaoteros. Según estudios basados en los residuos indican que las cáscaras del cacao, presentan contenido fenólico, biodisponibilidad y sus efectos de promoción de la salud [13].

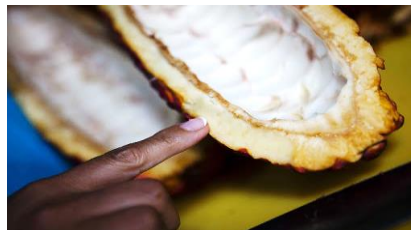


Figura 3. Cáscara de cacao.

2.1.3. Placenta.

La placenta del cacao, se encuentra en la parte interna del mismo, donde se encuentran adheridas las almendras de la mazorca de cacao, donde también, se lo denomina como maguey, posee una riqueza en sustancias pépticas, ácidos y azúcares.



Figura 4. Placenta de cacao.

2.1.4. Cromatografía HPLC.

Es un conjunto de técnicas, aplicadas y utilizadas para identificar sustancias, con el fin de separar distintos componentes que están situados en mezclas. Esta es una técnica efectiva y utilizada tanto a nivel investigativo como industrial, por lo cual esta técnica permite la purificación de compuestos [8].

2.1.5. Compuestos bioactivos.

Los compuestos bioactivos son fuentes nutricionales de aporte esencial y no esencial, que se encuentran en pequeñas cantidades de los alimentos brindando beneficios a la salud humana. En los granos de cacao estos compuestos bioactivos, se encuentran de forma natural o sintético, siendo los responsables de proporcionar sabor dulce, amargo, ácido y astringente [14].

2.1.6. Antioxidantes.

Los antioxidantes son moléculas encargadas de prevenir que los radicales libres no generen daño a las células por la producción de efectos tóxicos en el organismo humano debido al desequilibrio de oxidantes y antioxidantes [8].

2.1.7. Fitonutrientes.

Los fitonutrientes son aquellos que regulan la proliferación celular, la protección contra la inflamación y el estrés oxidativo, donde estos fitonutrientes que han tenido por estudio han sido las frutas, verduras, legumbres, cereales, frutos secos, semillas, té, aceite de oliva, vino, hierbas, especias y el chocolate, negro [15].

2.2. Marco Referencial.

2.2.1. Origen del cacao.

El cacao (*Theobroma cacao*, L.), es una materia prima importante producida especialmente en África Occidental, en países como Costa de Marfil y Ghana, aproximadamente con el 60% de la población mundial, y únicamente procesado en la Unión Europea con el 40% en el año 2014 según estudios basado en países como Indonesia, Estados Unidos y Brasil [13].



Figura 5. Origen del cacao.

2.2.2. Cacao en el Ecuador.



Figura 6. Cacao en Ecuador.

Durante el siglo XX Ecuador, fue la pieza importante entre los años 1870 y 1910, creando las primeras casas exportadoras de cacao. La provincia de Los Ríos se convirtió cuna de la producción cacaotera, denominada “Grandes Cacao” [16]. En Ecuador la base económica ha sido la exportación de productos agrícolas, por lo que, estos productos fueron de gran importancia como el cacao, que se cultivaba en pequeñas extensiones de tierra desde los tiempos coloniales [17].

En la figura 6, se observa el producto fresco para luego separar sus almendras y fermentarlas, el mismo que forman parte del compuesto lipídico, fibra, minerales, carbohidratos, proteínas y compuestos bioactivos como; polifenoles y metilxantinas. Sin embargo, este fruto es el ingrediente principal para elaborar chocolate, denominado como alimento de los dioses, debido a sus propiedades atribuidas por los pueblos de Centroamérica [13].

2.2.3. Producción de cacao en Ecuador.

La producción de cacao en Ecuador es un rubro de gran importancia, que genera fuentes de ingreso económico. El cacao es producido por agricultores quienes lo comercializan siendo una práctica habitual en el país [18].

La producción de cacao en Ecuador es representada en gran parte por pequeños productores, aproximadamente con el 70%, seguida de productores medianos con un 20%, y finalmente por los grandes productores con el 10%. El cacao es uno de los productos tradicionales de gran importancia para la exportación ecuatoriana [1].

2.2.4. Variedades de cacao.



Figura 7. Variedades de cacao.

1. *Cacao Nacional.*

Esta variedad también conocida como "Fino de Aroma", es el productor de mayor demanda y preferencia por los fabricantes de chocolate, debido a que sus granos de cacao se utilizan para producir los mejores chocolates del mundo [19]. Ecuador es el único país productor de esta variedad de cacao, caracterizado por tener una fermentación muy corta, de almendras suaves y ser de alta calidad.



Figura 8. Cacao Nacional.

Cacao Criollo.

El cacao criollo es considerado de "alta calidad" por ser una de las mejores materias primas para elaborar chocolate debido a su sabor y aroma floral. La almendra es de color blanco, proceden de un árbol frágil y de bajo rendimiento, es muy susceptible a enfermedades. Este cacao se lo encuentra en pequeñas áreas de producción cacaotera, correspondiendo del 5 al 10% de la producción mundial [20].



Figura 9. Cacao criollo.

Cacao Forastero.

El cacao forastero se lo caracteriza por ser una variedad denominada “cacao común o corriente”, su árbol es de gran rendimiento siendo resistente a enfermedades como la monilla. Su fruto representa aproximadamente el 80% del volumen de la producción mundial [21]. Este cacao se caracteriza por tener una cáscara dura, las habas son planas de color púrpura oscuro con un total a más de 30 almendras por mazorca, que tienen diferentes sabores adecuados para fabricación de chocolates suaves [22].



Figura 10. Cacao forastero.

Cacao Trinitario.

El cacao trinitario es una variedad que nace a partir de la unión genética del cacao criollo y forastero, esta planta es fuerte por lo que su tronco es grueso y de hojas grandes. Su mazorca presenta una variedad en color y formas, por lo que su semilla es grande. Actualmente es una de las variedades mayormente cultivadas a nivel mundial [23].



Figura 11. Cacao trinitario.

2. Cacao CCN-51.

El clon de la “Colección Castro Naranjal”, es mundialmente conocido como CCN-51, se considera un tipo de cacao a granel utilizado para producir chocolates de menor calidad (confitería) y productos como cacao en polvo [19].



Figura 12. Variedades del cacao CCN-51.

Cacao Trinitario.

El cacao trinitario es un cacao genéticamente modificado por la unión de dos variedades de semillas de cacao siendo estas; criollo y forastero, dando como resultado al cacao trinitario. La mazorca de este cacao se diferencia de las demás por su color interno de la corteza (amarillo blanquecino), su tamaño y forma son planas, de tal manera que su almendra es grande y de color púrpura [23, 8].



Figura 13. Cacao trinitario.

2.2.4. Cadena de suministro del cacao.

1. Cosecha.

El proceso de cosecha se realiza cuando la mazorca se encuentra en estado de madurez fisiológica después de 5 o 6 meses de haber sido fecundada la flor, donde se observan cambios en su pigmentación de verde a amarillo (fuerte o pálido). Se recomienda no cosechar las mazorcas en estado verde por lo que provoca un alto índice de almendra violeta sin fermentar. Por el contrario, si la cosecha dura más, los granos corren el riesgo de aparición y germinación de las almendras, reduciendo el rendimiento en peso y calidad [10].

En el caso de las mazorcas maduras o pintonas, estos frutos no tienen suficiente cantidad de azúcar y humedad en la pulpa para una fermentación satisfactoria. Las almendras se extraen, sin placenta porque por falta de alternativas se elimina en el campo sin darle ningún valor, a pesar de que tiene características organolépticas aceptables; el tiempo de apertura de las mazorcas no debe ser superior a 12 horas después de la cosecha para evitar que las almendras se sequen [10].



Figura 14. Cadena de valor del cacao.

2. Postcosecha.

La postcosecha es un proceso importante donde define la calidad del producto final y para el desarrollo de sus características organolépticas, siendo la fermentación y el secado las etapas de mayor influencia para la obtención de un producto de calidad, ya que estos dependen de las características finales de color, aroma y sabor del chocolate [24]



Figura 15. Cosecha y procesamiento del cacao.

3. Fermentación.

El proceso de fermentación consiste en secar las almendras, eliminando el embrión y fijando el aroma y el sabor para obtener un chocolate de excelente calidad comercial. En este proceso intervienen los microorganismos “levaduras” quienes se alimentan de los azúcares descomponiendo la pulpa, dejando únicamente a la semilla; Esto se debe a la temperatura, el pH y las concentraciones de azúcar [24].

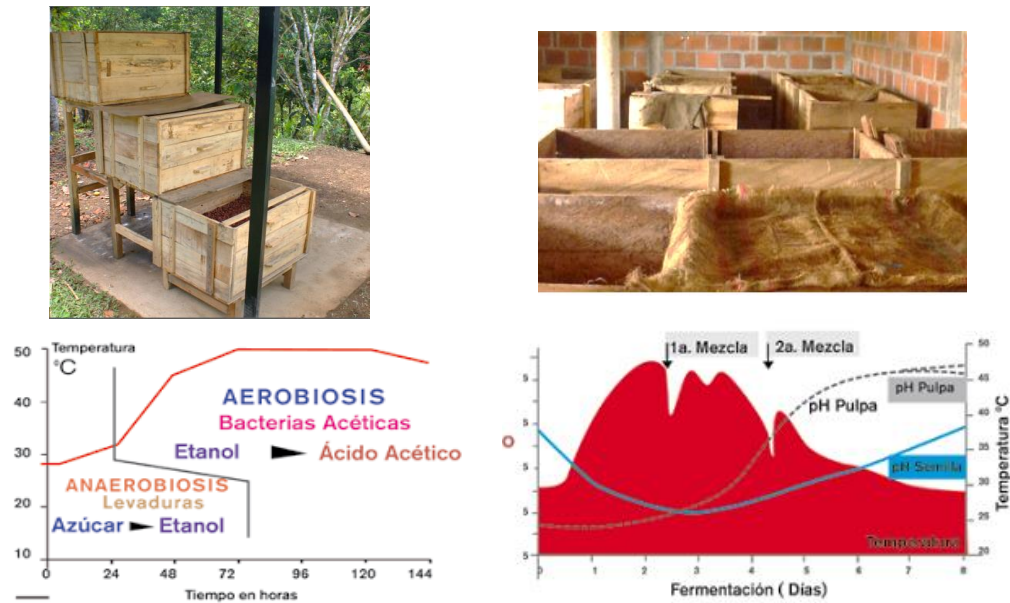


Figura 16. Proceso de fermentación del cacao.

La fermentación se desarrolla en las siguientes fases:

Fase azucarada: En esta fase, las almendras se extraen de la mazorca, donde comienza la acción de los microorganismos, que consumen la pulpa rica en hidratos de carbono (20° Brix), el mismo que parte con bajo pH (4,5) y contenido de oxígeno, favoreciendo a las levaduras que predominan en las primeras 24 horas [24].



Figura 17. Fermentación.

3.1.Fase alcohólica: Esta fase comienza con las levaduras anaerobias, que durante las primeras 48 horas, inician su etapa de fermentación alcohólica, transformando los azúcares de la pulpa en alcohol etílico. La estructura de la pulpa se rompe liberando agua y CO₂; generando un aumento en la temperatura aproximadamente hasta los 45° C, donde el pH se incrementa a medida que se desarrolla el proceso, favoreciendo a las levaduras [25].



Figura 18. Fase Alcohólica.

3.2.Fase acética: En esta fase a medida que se forma el alcohol debido a la fermentación del azúcar, aumenta el pH y la temperatura se incrementa de 48° C a 51° C, donde predominan las bacterias acéticas donde utilizan el alcohol para realizar la fermentación en condiciones aeróbicas. Como resultado de esta segunda fermentación, la concentración de ácido da un olor a vinagre [25].



Figura 19. Fase Acética.

3.3.Etapa de oxidación: En esta etapa, la humedad libre disminuye, mejorando las condiciones generales de aireación, lo que genera una diferencia en la concentración de ácido acético entre la parte interna y externa de la semilla. Donde la fermentación acética disminuye haciendo que ya que no haya más alcohol para transformar y el interior del grano continúa modificándose física y bioquímicamente, debido a la degradación de polifenoles (disminuye la astringencia), menos color violeta (degradación de antocianinas), reducción de alcaloides (disminuye el amargor), síntesis de quinonas (formación de coloración parda) [25].



Figura 20. Fase de Oxidación del cacao.

4. Secado.

El proceso de secado consiste en aplicar el cacao al calor a una capa de grano de poco espesor, la cual debe moverse las almendras de forma constante iniciando con un secado lento de 48 horas y la temperatura no debe exceder a los 75°C con una humedad de la almendra hasta un 7% [10].

El efecto de secado se optimiza cuando se logra la combinación de los siguientes factores ambientales:

1. El menor porcentaje (%) de humedad en el aire que entra en contacto o está cerca del cacao.
2. La mayor temperatura del aire, considerando un límite de 60° C.
3. La mayor velocidad con la cual el aire se renueva pasando entre y sobre el cacao.
4. El mayor porcentaje (%) de la superficie del grano queda expuesta al aire.

Tipos de secado:

4.1.Secado Natural: la principal fuente de energía es el sol que calienta el ambiente, de modo que el aire se mueve naturalmente sin intervención del hombre.



Figura 21. Secado Natural.

4.2.Secado Artificial: es un mecanismo que permite remover constantemente el cacao, por lo cual los requerimientos de mano de obra son menores que en otros sistemas, aumentando de nuevo el consumo energético [25].



Figura 22. Secado Artificial.

2.2.5. Manejo de Postcosecha de la cadena de valor del cacao.

La postcosecha es una técnica que se realiza entre la cosecha y el procesamiento del grano de cacao. Este proceso consiste en etapas como: cosecha, clasificación, triturado, extracción de las almendras, fermentación, secado, limpieza y empaque; concluyendo con el transporte de la almendra seca y lista. Sin embargo, los puntos críticos del manejo de postcosecha se dan en el proceso de fermentación y secado del grano, siendo un proceso rudimentario. Principalmente por que los productores no cuentan con herramientas y técnicas para medir la temperatura y evaluar las característica externas e internas de la semilla [26].

2.2.6. Residuos generados por la cadena de beneficio del cacao.

La valorización de residuos presentes en la cadena agroindustrial, mediante la implementación de economía circular basada en una política "cero residuos" con un impacto ambiental positivo que promueve la reutilización, el reciclaje y recuperación de desperdicios. Dentro de los compuestos de alto valor biológico se encuentran los antioxidantes, o moléculas encargadas de proteger nuestro sistema inmunológico de algún efecto negativo producido por la presencia de radicales libres [3].

Los polifenoles son moléculas aportadas principalmente por las plantas, que presentan propiedades antimicrobianas contra patógenos, capacidad de eliminar radicales libres y efectos preventivos contra diversas enfermedades degenerativas (ECNT), como el cáncer y enfermedades cardiovasculares [13].

2.2.6.1. *Mazorca de cacao.*

La mazorca es la parte externa de corteza fuerte del cacao la cual protege las semillas quienes se encuentran en su interior, esta mazorca protege al fruto de condiciones climáticas adversas y plagas, la cual mide 15-30 cm de largo y 10 cm de ancho con una masa de unos 500g, su color y tamaño es diferente de acuerdo a la variedad y las condiciones del cultivo. En la madurez, la mayoría de las veces tiene un color rojizo o parduzco. El pericarpio es relativamente carnoso, de 10 a 15 mm de espesor, se vuelve más duro y resistente en la maduración [26].

En el siguiente estudio realizado por la variedad de Complejo NacionalxTrinitario, sus resultados son visualizados en la siguiente tabla.

Composición química de la mazorca de cacao.

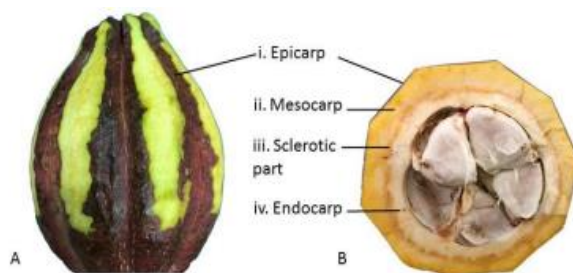


Figura 23. Composición de la mazorca de cacao.

La mazorca de cacao está compuesta de; epicarpio, mesocarpio, la parte esclerótica y el endocarpio. La tabla 1 muestra la composición química de la mazorca de cacao donde, el epicarpio está enriquecido con lignina, mientras que el mesocarpio contiene más o menos el 50% de celulosa y el endocarpio es rico en sustancias pécticas.

Las principales hemicelulosas que se encuentran en la mazorca de cacao son el xilano, arabinoxilano y arabinan que se han deducido de la alta cantidad de arabinosa y xilosa aislables. Otras hemicelulosas como xiloglucanos, galactomananos o (galacto) glucomananos. La lignina es un heteropolímero aromático complejo, formado por unidades de fenilpropano (p-cumarilo, alcoholes de coniferilo y sinapilo) y está unido a la celulosa y la hemicelulosa, proporcionando rigidez a la pared celular de la planta. Taninos condensados altamente polimerizados estructuras y podría unirse a la lignina en CPH con un contenido de peso seco de 5,2% [27].

Tabla 1. Composición química y nutricional de la mazorca de cacao.

Composición	Cantidad (%, p/p, peso seco)
Proteína	7 – 10
Grasa	1,5 – 2
Carbohidrato	32 – 47
Celulosa	19,7 – 26,1
Hemicelulosa	8,7 – 12,8
Xilano & Arabinoxilano (%)	
Lignina	14 – 28
Pectina	6,0 – 12,6
Ceniza	6,4 -8,4
Minerales	
	K 2,8 – 3,8
	Ca 0,25 – 0,46
	Mg 0,11 – 0,25
	P 0,19
	Na 0,01 – 0,02
	Fe 0,003 – 0,006
Contenido de Polifenoles (g GAE ¹ /100g)	4,6 – 6,9

Fuente: [27].

2.2.6.2. Placenta de cacao.

La placenta de cacao es el eje central de la mazorca donde se encuentran sujetos los granos de cacao, la misma que contiene un considerable contenido de azúcares, junto con la cáscara y el mucilago constituyen un residuo que no es utilizado durante el proceso de secado. En la siguiente tabla se visualiza los resultados de la variedad de CCN-51.

Tabla 2. Componentes de la placenta de cacao.

Componentes	(Base Humedad)
pH	5,41
Acidez Titulable	0,12
Humedad	83,52
Materia Seca	0,77-1,52
Cenizas	16,48

Fuente: [28]

Composición química de la placenta de cacao.



Figura 24. Composición de la placenta de cacao.

La placenta de cacao es un residuo poco valorado y generalmente rechazado durante el tratamiento de las mazorcas de cacao. El objetivo de este estudio es contribuir a la valorización de la placenta de cacao para contribuir a la seguridad alimentaria [29].

Tabla 3. Composición fisicoquímica de la placenta de cacao.

Parámetros (%)	Placenta de cacao	
	Seca	Fermentada
Humedad	80.55 ± 0.42 ^a	88.89 ± 1.49 ^b
pH	4.7 ± 0.14 ^b	3.66 ± 0.26 ^a
Azúcares totales	13.27 ± 1.24 ^b	6.71 ± 0.11 ^a
Reducción de azúcares	8.68 ± 0.07 ^b	4.92 ± 0.02 ^a
Fibra	30.66 ± 3.40 ^a	42.66 ± 2.05 ^b
Lípidos	0.46 ± 0.09 ^a	1.73 ± 0.19 ^b
Proteínas	5.12 ± 0.02 ^a	8.4 ± 0.13 ^b
Cenizas	9.34 ± 0.89 ^a	10.37 ± 0.54 ^b

Fuente: [29].

2.2.6.3. Composición nutricional de la placenta de cacao.

Consumo diario de alimentos, que contienen placenta de cacao podría cubrir estas necesidades y así prevenir el riesgo de anemia. De hecho, el hierro es un constituyente esencial para hemoglobina y su correcto funcionamiento. Está también participa en muchas reacciones enzimáticas.

Tabla 4. Composición nutricional de la placenta de cacao.

Contenido de minerales.	Placenta de cacao.	
	Fresco (g/100g)	Fermentado (g/100g)
Mg	128.89 ± 0.99 ^a	212.58 ± 1.03 ^b
K	1 945.52 ± 0.71 ^a	3 405.51 ± 2.21 ^b
P	154.11 ± 2.85 ^a	173.18 ± 0.65 ^b
Ca	92.47 ± 1.42 ^a	122.37 ± 0.81 ^b
Na	9.34 ± 0.71 ^a	9.33 ± 0.81 ^a
Zn	1.87 ± 0.27 ^a	21.78 ± 1.08 ^b
Cu	3.74 ± 0.45 ^a	6.22 ± 0.32 ^b
Mn	0.93 ± 0.18 ^a	UD
Fe	2.80 ± 0.27 ^b	1.04 ± 0.50 ^a

Fuente: [29].

2.2.7. Valorización de residuos de la industria alimentaria.

La producción industrial alimentaria, requiere del desarrollo de nuevas tecnologías, implementando la valorización de residuos presentes en el cacao para crear nuevos productos que satisfaga las necesidades de la sociedad por la adquisición de un producto de mejor calidad proveniente de procesos más amigables con el medio ambiente [3].

Los residuos producidos por las industrias agroindustriales los cuales no son destinadas a la producción de alimentos. Estos residuos se los considera como materia prima para la elaboración de un subproducto implementando sus propiedades beneficiosas para la salud y su creciente popularidad como ingredientes de alimentos funcionales dentro de su formulación creando productos de alto valor añadido [30].

2.2.8. Biorrefinería (valorización de residuos).

La biorrefinería es una instalación donde implica el desarrollo de tecnologías basándose en el proceso de residuos biológicos agroindustriales, siendo de gran importancia al usar estos desechos sólidos como parte del proceso de biotecnología, para la aplicación ambiental específicamente para la limpieza del agua y sus recursos promoviendo la salud humana.

En la industria alimentaria, por su parte, se basa en la química verde y tecnologías limpias, potencian el valor de la biomasa residual al promover la producción de biocombustibles y bio-productos con alto valor agregado y así contribuyen el desarrollo de la bioeconomía [3]. Además de la identificación de compuestos bioactivos el uso de residuos de la cadena de beneficio de cacao permitirá cumplir con los objetivos de desarrollo sostenible propuesto por las naciones unidas, como se detalla a continuación.

2.2.9. Objetivos de desarrollo sostenible (ODS).

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible, denominado ODS de las Naciones Unidas requieren una observación en los desechos y subproductos. Estas nuevas tecnologías y técnicas de conservación adecuadas, las cuales se destinan a prolongar la vida útil de un producto, reduciendo la contaminación, y previenen la degradación de compuestos nutricionales para la incorporación de la cadena productiva [31].

2.2.10. Impacto ambiental.

Actualmente las preocupaciones que existen debido al cambio climático, producidos por residuos que descartan las agroindustrias, generando una tasa y volumen elevado de descomposición a gran escala convirtiéndolo en un problema asociado a la producción de gases de efecto invernadero, productos de degradación tóxicos y proliferación de bacterias patógenas. Proliferación de microorganismos [32].

2.2.11. Economía circular.

La economía circular en la industria alimentaria se basa en ser una tecnología determinado "residuo cero" donde promueve un impacto ambiental positivo, empleando las tres R; reutilizar, reciclar y recuperar este desperdicio. La legislación de la economía circular ha llevado la investigación a nuevos límites, para un crecimiento económico sostenible con respecto al medio ambiente y la preservación de los recursos naturales. Las alternativas renovables implican la generación de energía y productos químicos; Adicionalmente los procesos deben agotar completamente los sustratos y generar la mínima cantidad de desechos [33].

2.2.12. Ecodiseño.

El ecodiseño teniendo por finalidad integrar los aspectos ambientales con el diseño y desarrollo de un producto, reduciendo el impacto ambiental adverso [34]. Al aplicar estrategias permite tomar decisiones sobre la sostenibilidad de los productos y servicios. Dando la posibilidad de reparación, actualización, remanufactura de productos y la mejora de la reciclabilidad de los materiales con el diseño del producto [35]. El objetivo del diseñador es desarrollar productos y servicios que encajen en la economía circular con los principios del ecodiseño. El diseñador siempre busca el mejor compromiso entre las pautas de ecodiseño y los demás requisitos del producto (técnicos, económicos y humanos) [36].

2.2.13. Cromatografía.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se desarrolló en el principio de la década de 1960. Hoy se ha convertido en una herramienta esencial para el moderno laboratorio analítico y ha sustituido la cromatografía de gases (GC) por una variedad de análisis. HPLC es una técnica que generalmente se trata en cursos de pregrado dedicados a los métodos analíticos instrumentales [37].

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias a analizar (contenidas en la fase móvil), y la columna cromatográfica (fase estacionaria), mediante el bombeo de la fase móvil a través de la columna [38].

2.2.14. Fuente de compuestos bioactivos.

Los compuestos bioactivos son componentes extra nutricionales que se encuentran en pequeñas cantidades en los alimentos y brindan beneficios para la salud más allá del valor nutricional básico del producto. Estos compuestos varían ampliamente en estructura y función química y se agrupan en consecuencia. Algunos ejemplos de compuestos bioactivos son carotenoides, flavonoides, carnitina, colina, coenzima Q, ditioltionas, fitoesteroles, fitoestrógenos, glucosinolatos, polifenoles y taurina. Dado que las vitaminas y los minerales provocan efectos farmacológicos, también pueden clasificarse como compuestos bioactivos [39].

2.2.15. Compuestos Bioactivos.

Los compuestos bioactivos son fuentes nutricionales de aporte esencial y no esencial, que se encuentran en pequeñas cantidades de los alimentos brindando beneficios a la salud humana [40]. En los granos de cacao estos compuestos bioactivos, se encuentran de forma natural o sintético, siendo los responsables de proporcionar sabor dulce, amargo, ácido y astringente [14].

Polifenoles.

Los polifenoles forman parte del grupo de compuestos bioactivos (ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcaloides fenólicos y flavonoides) ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal que forman parte de la dieta humana. Las frutas, verduras y bebidas producidas por las plantas (té, café, vino tinto y jugos) forman parte de fuentes dietarias de polifenoles. también se encuentran en frutos secos, semillas, cereales y chocolate [8].

Flavonoides.

El flavonoide del cacao tiene efecto beneficioso potencial contra el riesgo de síndrome metabólico, hipertensión, lípidos en sangre, accidente cerebrovascular, cáncer, función cognitiva y demencia. Los flavonoides se pueden clasificar en: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavonoles [41].

Metilxantinas.

Las metilxantinas, son alcaloides farmacológicamente activos responsables de dar el sabor a cacao amargo y a su vez brinda efectos fisiológicos tales como; estimulación al sistema nervioso central y secreción gástrica, diuresis, broncodilatación y estimulación del esqueleto muscular en altas dosis (Quelal et al, 2020). Las metilxantinas están compuestas de la siguiente manera; cafeína (1, 3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) y teofilina [42].

Alcaloide.

El efecto protector de los alcaloides se ha relacionado principalmente con su potencial prevención contra enfermedades cardiovasculares (ECV). Teobromina, el principal alcaloide del cacao, se ha encontrado que aumenta el colesterol bueno o HDL en suero concentraciones controladas de acuerdo con un ensayo aleatorizado, lo que sugiere un posible efecto protector contra ECV. Sin embargo, debido a la novedad del tema, los efectos en la salud de Los alcaloides de unión insoluble aún no se han abordado [43].

2.2.16. Propiedades funcionales.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a la capacidad de eliminar radicales libres, donando átomos de hidrógeno, electrones o cationes metálicos quelatos. Las estructuras moleculares, en particular el número y las posiciones de los grupos hidroxilo, y la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos, confieren a los compuestos fenólicos la capacidad de inactivar radicales libres, lo que se conoce como relación estructura-actividad (SAR). Ambos compuestos comparten un número similar de grupos hidroxilo, en las mismas posiciones, sin embargo, la quercetina también contiene un doble enlace 2,3 en el anillo C y la función 4-oxo [44].

2.2.17. Actividad antioxidante.

Los antioxidantes son sustancias presentes en bajas concentraciones que retrasan o inhiben significativamente oxidación. Según las investigaciones, los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, clorofila derivados, aminoácidos y aminos), carotenoides o ácido ascórbico [45].

El cacao y sus derivados, tales como cacao en polvo, licor de cacao y chocolate son fuentes de metilxantinas, compuestos fenólicos como epicatequina, polifenoles y antocianinas, y una gran variedad de compuestos volátiles (por ejemplo, 4-metil-2-fenil-2-pental y 5-metil-2-fenil-2- hexenal) que son responsables del sabor astringente y amargo de los granos de cacao [46].

2.2.18. Capacidad Antioxidante.

El cacao y sus derivados, tales como cacao en polvo, licor de cacao y chocolate son fuentes de metilxantinas, compuestos fenólicos como epicatequina, polifenoles y antocianinas, y una gran variedad de compuestos volátiles (por ejemplo, 4-metil-2-fenil-2-pental y 5-metil-2-fenil-2- hexenal) que son responsables del sabor astringente y amargo de los granos de cacao [46].

Ácido ascórbico y tocoferol.

El ácido ascórbico es conocido por su actividad antioxidante, por lo tanto, se usa en cosmética y tratamientos de enfermedades degenerativas. La vitamina C tiene muchos efectos fisiológicos funciones, entre ellas se encuentra una capacidad altamente antioxidante para reciclar la vitamina E en la membrana y peroxidación lipídica de lipoproteínas [45].

Tocoferoles.

Los tocoferoles y tocotrienoles se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. La vitamina E es el nombre común dado a un grupo de compuestos liposolubles de los cuales el α -tocoferol, es el más conocido. Se encuentra en lipoproteínas y membranas que bloquean la reacción en cadena, de la peroxidación lipídica eliminando los radicales peroxilo intermedios que se generan altamente [40].

Carotenoide.

Los carotenoides forman parte de la actividad antioxidante con la capacidad de deslocalizar electrones desapareados, a través de su estructura de dobles enlaces conjugados. Estos metabolitos secundarios no son muy eficientes como extintores de radicales peroxilo, pero son capaces de apagar el oxígeno singlete, ayudando así en la protección de los lípidos contra el daño peroxidativo [45].

Los carotenoides consisten en un grupo de compuestos pigmentados lipofílicos que se compone de más de seiscientos pigmentos vegetales solubles en grasa. Los cuales son responsables de dar colores como; amarillo, rojo y naranja. Los carotenoides presentes en la dieta humana son el α -, β -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, astaxantina y β -criptoxantina, estos compuestos desempeñan un papel activo en la protección de efectos dañinos y flageladores de la exposición a la luz solar [47].

Alcaloides.

Los alcaloides se relacionan principalmente por su potencial contra enfermedades cardiovasculares (ECV). Teobromina, el principal alcaloide del cacao, por lo que aumenta el colesterol bueno (HDL) siendo un protector contra ECV. Cafeína, es el otro alcaloide benefactor que previene el Alzheimer.

2.2.19. Efecto de los compuestos bioactivos en la salud.

La alimentación durante el transcurso de las últimas décadas ha sido una de las preocupaciones en el ser humano, anteriormente se creía que consumir alimentos que confieran nutrientes y energía era suficiente para tener una alimentación saludable, hoy en día los alimentos funcionales están traspasando barreras puesto que además de nutrir, aportan algunos compuestos con propiedades fisiológicas a la salud humana. Para que un alimento sea declarado como funcional este debe de ser comprobado con una evidencia científica válida y suficiente para justificar la investigación.

No se puede atribuir la disminución del riesgo de una enfermedad específica, pero en combinación con un estilo de vida saludable y un consumo constante del fitoquímico específico se podría reducir estas patologías. Su importante acción antioxidante juega un papel importante influyendo en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos con efectos beneficiosos para la salud. La ingesta media de nutriente antioxidantes es de 100 mg/día. Sin embargo, el consumo de fitoquímicos con actividad antioxidante supera los 1000 mg/día [10].

2.2.20. Efecto benéfico en la salud.

El consumo de productos alimenticios que ayudan a prevenir el daño oxidativo en el cuerpo humano. Por lo que este daño oxidativo contribuye al desarrollo de enfermedades como las cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (primario). Existe una gran cantidad de evidencia disponible sobre el potencial antioxidante de varios nutrientes bien conocidos, como la vitamina C y la vitamina E. Además, se realizan estudios científicos sobre el potencial de otros nutrientes para funcionar como antioxidantes [48].

2.2.21. Efecto antiinflamatorio.

Actualmente existen enfermedades de origen cardiovascular, que afecta con gravedad a la población, por lo que se busca una metodología que implemente los residuos del sector cacaotero, mazorca y placenta de cacao. El objetivo de la industria alimentaria es aumentar la demanda de alimentos saludables con componentes funcionales como los alimentos fermentados o alimentos con compuestos bioactivos y está liderando la necesidad de desarrollar productos que aporten componentes funcionales [49].

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen nutrientes esenciales, tales como; microorganismos probióticos, compuestos bioactivos, los cuales ayudan a modular los procesos metabólicos y promueven la salud. Según estudios demuestran que el consumo de alimentos funcionales tiene numerosos beneficios para la salud, como la reducción del riesgo de cáncer, los síntomas de la menopausia, la presión arterial y la osteoporosis; mejora de la función inmune; y mejora de la salud cardíaca y gastrointestinal, efectos antiinflamatorios y actividades antibacterianas y antivirales [49].

2.3. Marco Referencial.

Para la elaboración de este proyecto investigativo, se toma en cuenta diversas clases de trabajos publicados como referencia entre ellos están; revistas científicas, repositorios digitales y bibliotecas virtuales, los cuales serán detallados continuación.

De acuerdo al capítulo 1 del libro de *Bioactive Compounds* publicado por Segura Campo, el cuál trata sobre los Compuestos bioactivos: Beneficios para la salud y posibles aplicaciones. Indica que la mayoría de los organismos vivos requieren de Oxígeno (O₂), por lo que es esencial por vida. Un organismo requiere un proceso llamado oxidación, que implica la pérdida de electrones, en condiciones fisiológicas, los agentes oxidantes y las defensas antioxidantes están en equilibrio, enzimas como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y antioxidantes no enzimáticos como el glutatión y las vitaminas C y E se encuentran entre las moléculas de defensa antioxidantes.

El predominio de oxidantes y su consiguiente daño se denomina estrés oxidativo y se considera como un agente etiológico o patógeno de enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas, como cáncer, Alzheimer, diabetes y envejecimiento, entre otros. Sin embargo, la producción de radicales libres excede la capacidad antioxidante de un sistema vivo, donde pueden reaccionar con lípidos, proteínas y ADN que causa daño estructural y funcional a enzimas y material genético [40].

Esta práctica permite la valorización de residuos presentes en la cadena agroindustrial, mediante la implementación de economía circular basada en una política "cero residuos" con un impacto ambiental positivo que promueve la reutilización, el reciclaje y recuperación de desperdicios. Dentro de los compuestos de alto valor biológico se encuentran los antioxidantes, o moléculas encargadas de proteger nuestro sistema inmunológico de algún efecto negativo producido por la presencia de radicales libres [50].

Los polifenoles son moléculas aportadas principalmente por las plantas, que presentan propiedades antimicrobianas contra patógenos, capacidad de eliminar radicales libres y efectos preventivos contra diversas enfermedades degenerativas (ECNT), como el cáncer y enfermedades cardiovasculares [13].

Yépez en el año 2017, realizó un estudio sobre la caracterización del perfil de polifenoles en cacao CCN-51, esta investigación se enfocó en las principales zonas productoras del Ecuador, tales como: Los Ríos, Guayas y Manabí. La identificación y cuantificación de los polifenoles realizadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) empleando un detector de arreglo a Diodos (DAD) a 280 nm. En este estudio el autor evaluó el efecto del ambiente sobre los contenidos de polifenoles, demostrando que existe un efecto del origen de las en la concentración de estos antioxidantes. Las muestras de la provincia de Guayas presentaron la mayor concentración de Procianidina B₁ (0,88 mg•g⁻¹), Procianidina B₂ (6,42 mg•g⁻¹), Procianidina C₁ (4,16 mg•g⁻¹) y epicatequina (13,58 mg•g⁻¹), mientras tanto en la provincia de Los Ríos evidencio mayor concentración de catequina (2,81 mg•g⁻¹) [51].

2.4. Marco Legal.

2.4.1. Objetivos de desarrollo sostenible (ODS).

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible, denominado ODS de las Naciones Unidas requieren una observación en los desechos y subproductos. Estas nuevas tecnologías y técnicas de conservación adecuadas, las cuales se destinan a prolongar la vida útil de un producto, reduciendo la contaminación, y previenen la degradación de compuestos nutricionales para la incorporación de la cadena productiva [31].

2.4.2. Sistema de gestión medioambiental (SGM) ISO 14001.

La familia de normas de la ISO 14000 son normativas estándares relacionadas con la gestión ambiental, por lo que ayuda a las organizaciones a minimizar los impactos medioambientales que genera por medio de sus operaciones y para cumplir con ello se debe emplear tanto la normativa, legislación o requisitos aplicables, que disminuyan el impacto ambiental.

La ISO 14001 es una norma muy relevante de esta familia estándar, por lo que está centrada en el punto de Implementar un Sistema de Gestión Ambiental (SGA) en las empresas y organizaciones. Sin embargo, el objetivo principal de esta norma es mejorar las prácticas ambientales, minimizando los residuos o ahorro de costes, entre otros [52].

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

El análisis fisicoquímico realizado a muestras residuales de mazorca y placenta de cacao, se llevó a cabo por el método analítico de cromatografía líquida no preparativa de alta resolución (HPLC), en la institución INIAP, cuya localización se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Localización del trabajo experimental.

INVESTIGACIÓN	LOCALIZACIÓN
Recolección y Preparación de la muestra.	○ Recolección, fermentación, secado y congelado de las muestras. Asociación “La Cruz”, perteneciente al cantón Mocache, provincia de Los Ríos. ○ Congelación, secado y liofilizado: Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), D Mejía - Quito, Pichincha.
Análisis Físico-Químico.	○ Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias (INIAP), ubicada en Mejía, Pichincha (Quito).

Elaborado por: Chuez Sabando Katherine (2022).

3.2. Tipo de investigación.

Esta investigación se basa en una revisión literaria, cuyo propósito es conocer, contrastar e indagar estudios sobre los residuos de cacao (*Theobroma cacao*, L) y sus compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides y metilxantinas), que permita analizar las muestras de manera directa mediante técnicas experimentales específicas por medio de una investigación cuantitativa. Sin embargo, siendo un estudio de campo esta investigación consiente en tomar muestras de fincas productoras de cacao Nacional y CCN-51 como se detalla a continuación.

3.2.1. Investigación descriptiva.

La investigación descriptiva, es un método que permite recopilar, describir y analizar información cuantificable que se utiliza en un análisis estadístico, donde sirve como herramienta para investigar las variables, hipótesis, comportamientos y características de un estudio de campo [53].

3.2.2. Investigación exploratoria.

La investigación exploratoria, es aquella que permite explorar el tema más a fondo, permitiendo integrar y explicar los fenómenos de estudio, recaudando información para reconocer, ubicar y definir el problema, de tal manera que fundamente la hipótesis y establece el esquema de la metodología experimental definitiva de la investigación [8].

3.2.3. Investigación experimental.

La investigación experimental, es la que lleva a cabo el análisis de efecto producido por una o más variables independientes sobre una o más variables dependientes [54].

Esta investigación es experimental, debido a que requiere de laboratorios, equipos e instrumentos modernos y de calidad, materiales, reactivos, y técnicas que permitan determinar el contenido de polifenoles, flavonoides y metilxantinas en muestras secas residuales de cacao.

3.3. Método de investigación.

3.3.1. Método inductivo-deductivo.

Para efectuar este estudio se aplicó el método inductivo-deductivo, el cual permitió encontrar posibles soluciones en el aprovechamiento de estos residuos en la industria alimentaria por la presencia de compuestos bioactivos en la mazorca y placenta de cacao. Sin embargo, el problema que genera la acumulación de residuos del sector productor cacaotero, permite establecer condiciones tecnológicas adecuadas y parámetros físico-químicos adecuados para la valorización de estos residuos [55].

3.3.2. Método estadístico.

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

3.3.3. Método experimental.

Para el análisis experimental se utilizó las variables de estudio, para ello se observan los resultados de la identificación de los perfiles de compuestos bioactivos cromatográficos, donde se compararon con los compuestos bioactivos de la mazorca y placenta de cacao.

3.4. Fuente de recopilación de información.

Para el desarrollo de esta investigación se llevó a cabo la implementación de dos tipos de fuentes de recopilación de información.

3.4.1. Fuente Primaria.

Las fuentes primarias de información que se emplearon para el desarrollo de esta investigación se componen por trabajo de campo y pruebas de laboratorio mediante:

- Recolección de muestras frescas de mazorca y placenta de cacao (CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario).
- Pre-ensayos o manuales.
- Caracterización fisicoquímica y funcional.

3.4.2. Fuente Secundaria.

Las fuentes secundarias permitieron recopilar información donde se obtuvo material bibliográfico que sirvió de referencia para plantear el desarrollo metodológico del estudio, así como el análisis e interpretación de resultados mediante las fuentes de información:

- Artículos Científicos
- Libros
- Revistas Científicas
- Tesis Doctorales
- Tesis de Pregrado

3.5. Diseño de la investigación.

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la prueba “t de Student” y correlación de Pearson, con la finalidad de comparar de forma independiente los contenidos de polifenoles, flavonoides y metilxantinas de la mazorca y la placenta de cacao, empleando el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando la siguiente combinación de tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6. Combinación de tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (mazorca y placenta).

Réplicas	Clon de CCN-51	Complejo NacionalxTrinitario
1	γ_{10}	γ_{20}
2	γ_{11}	γ_{21}
3	γ_{12}	γ_{22}

Elaborado por: Chuez Sabando Katherine, 2022.

El estudio se desarrolló considerando la siguiente hipótesis experimentales:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$ **H_0 :** No existe un efecto de la variedad de cacao (Clon de CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario) en el perfil fenólico, flavonoides y metilxantinas en mazorca y placenta de cacao.
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ **H_1 :** Existe un efecto de la variedad de cacao (Clon de CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario) en el perfil fenólico, flavonoides y metilxantinas en mazorca y placenta de cacao.

Para obtener resultados fiables, se evaluaron a un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

3.5.1. Esquema de ANDEVA.

En la Tabla 7, se muestra el esquema del ANDEVA para la prueba "t" de Student de dos muestras emparejadas. Utilizando el análisis estadístico "t" de Student, se evaluó el efecto de la variedad de cacao en la actividad antioxidante de las muestras de mazorca y placenta en estudio.

Prueba t-Student.

Esta investigación tiene por finalidad evaluar el efecto de la variedad en el perfil fenólico, flavonoide y metilxantina de la mazorca y placenta de cacao, donde se aplicó una prueba estadística denominada "t- de Student" (Tabla 7.).

Tabla 7. Prueba de t-Student (dos muestras comparadas) para evaluar el efecto de la variedad de cacao (Clon de CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario) en el perfil fenólico de la mazorca y placenta de cacao.

	Clon de CCN-51	Complejo NacionalxTrinitario
Media	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$
Varianza	$S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$	$S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$
Numero de observaciones	$n = 3$	$n = 3$
Grados de libertad	$GL = n - 1$	$GL = n - 1$
Estadísticos t	$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{S_d / \sqrt{n}}$	$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{S_d / \sqrt{n}}$
p(T<=t) una cola	$-t_{a,n=t_{1-a,n}}$	$-t_{a,n=t_{1-a,n}}$
Valor critico de t (una cola)	$(-t_{0,01,9}, \infty)$	$(-t_{0,01,9}, \infty)$
p(T<=t) dos colas	$(-t_{\frac{a}{2},n-1}, t_{\frac{a}{2},n-1})$	$(-t_{\frac{a}{2},n-1}, t_{\frac{a}{2},n-1})$
Valor critico de t (dos colas)	$(-t_{0,01,9}, \infty)$	$(-t_{0,01,9}, \infty)$

Elaborado por: Chuez Sabando Katherine, 2022.

3.5.2. Análisis de correlación.

El análisis de correlación de Pearson, es aquel que determina los compuestos bioactivos presentes en las muestras de mazorca y placenta de cacao, donde se llevó a cabo una matriz (Tabla 8), a través del coeficiente de correlación, permitirá visualizar el grado de correlación que existe entre los polifenoles y flavonoides tales como; Procianidina B₁, B₂ y C₁, Epicatequina, Catequina. Y en las metilxantinas están la Teobromina y Cafeína de las muestras a estudiar [55].

Tabla 8. Matriz de correlación para relacionar el perfil fenólico (polifenoles y flavonoides) de la mazorca y placenta de cacao con la actividad antioxidante.

PERFIL DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	Capacidad Antioxidante				
	Catequina (v)	Epicatequina (w)	Procianidina (x)	Cafeína (y)	Teobromina (z)
ABTS (x)	γ_{xv}	γ_{xw}	γ_{xx}	γ_{xy}	γ_{xz}
FRAP (y)	γ_{yv}	γ_{yw}	γ_{yx}	γ_{yy}	γ_{zy}
ORAC (z)	γ_{zv}	γ_{zw}	γ_{zx}	γ_{zy}	γ_{zz}

ABTS (decoloración del catión radical ABTS).

**FRAP (poder antioxidante reductor férrica).

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

Elaborado por: Chuez Sabando Katherine, 2022.

3.6. Instrumento de investigación.

Los instrumentos de investigación que se aplicaron en este estudio son los siguientes.

3.6.1. Muestreo.

Las muestras de las dos variedades de cacao; Complejo NacionalxTrinitario y Clon de CCN-51, es obtenida de la asociación “La Cruz”, del cantón Mocache perteneciente a la provincia de Los Ríos.

Diagrama del proceso experimental.

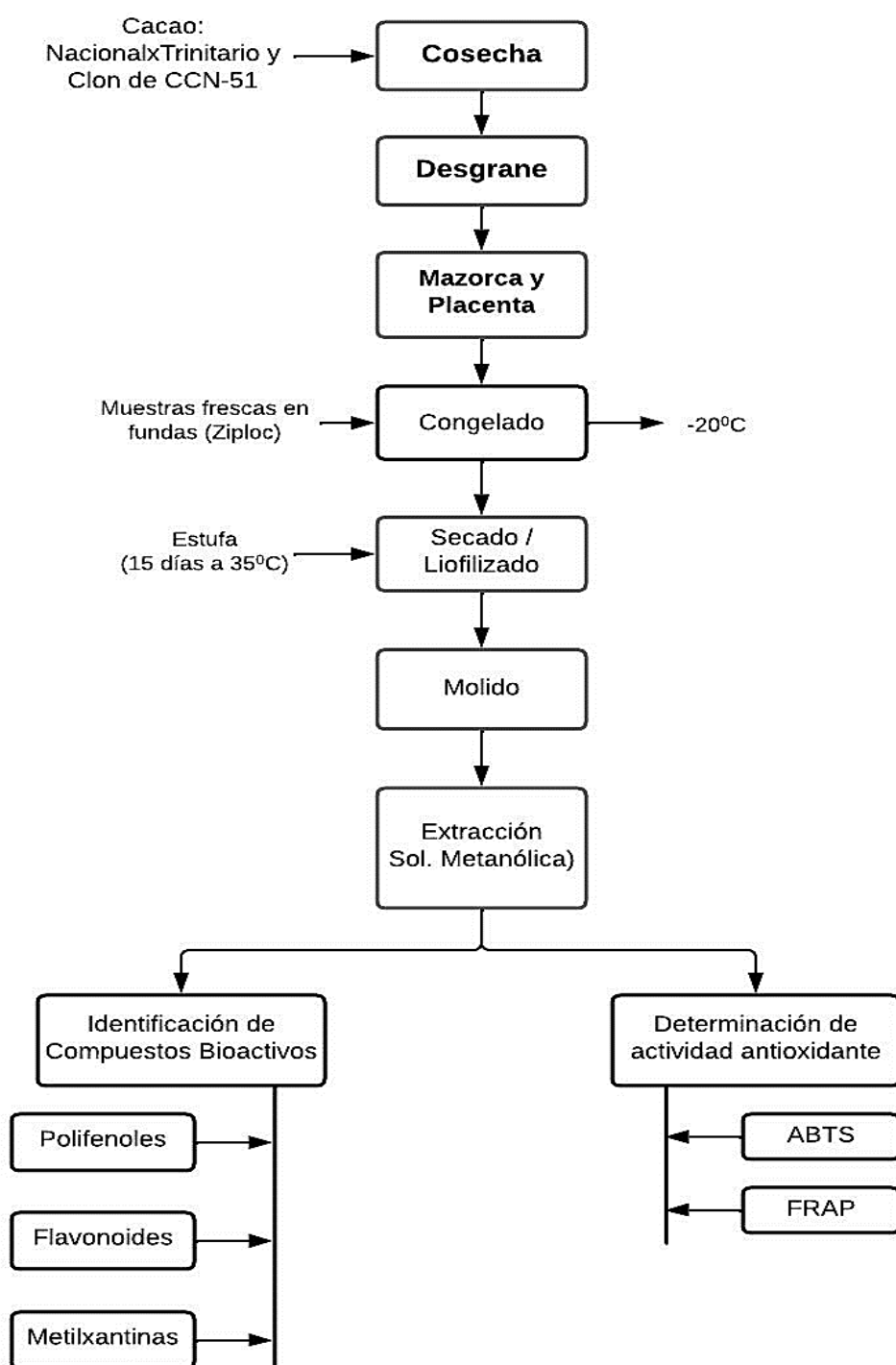


Figura 25. Diagrama de procesos, postcosecha de cacao.

3.6.2. Secado y liofilizado de la muestra de cacao.

Las muestras de cacao fueron extraídas a través del manejo de postcosecha de las variedades Nacional y CCN-51, las cuales se recolectaron en la Asociación “La Cruz”, ubicada en el cantón Mocache perteneciente a la provincia de Los Ríos. Donde se requirió de un protocolo establecido por el programa de cacao de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP. Las muestras de mazorca y placenta de cacao que se acopiaron en la Asociación “La Cruz”, fueron pesadas y almacenadas en bolsas herméticas (Ziploc) para evitar la reacción de Maillard y pérdida de nutrientes, las mismas que luego se guardaron en hieleras de plástico (dimensión de 25.5 cm de largo x 14.25 cm ancho x 13.5 cm de alto), donde se colocó en filas de 15kg de mazorca y 13Kg de placenta de cacao por las dos variedades.

Por consiguiente, estas mismas muestras permanecieron almacenadas y congeladas a una temperatura de -20°C para poder ser trasladadas al laboratorio (LSAIA) de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, y posteriormente se procedió a secar en una estufa a una temperatura de 35°C donde permaneció por 15 días para eliminar la cantidad de agua y continuar con el proceso de liofilizado y molido, una vez teniendo las muestras residuales permanecieron almacenados hasta la fecha de los análisis.

3.6.3. Preparación de muestras.

Para dicho estudio analítico, las muestras de mazorca y placenta de cacao fueron parte de un proceso de secado, liofilizado y almacenado en bolsas herméticos (Ziploc), los cuales se aislaron de la luz, humedad y la presencia del oxígeno con el fin de evitar algún tipo de reacción que afecte al equipo durante el análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.6.4. Extracción de compuestos bioactivos.

3.6.4.1. Componentes fenólicos.

- **Mazorca y Placenta de cacao.**

El proceso de extracción de los compuestos polifenólicos (flavan-3-oles), Catequina (CAT), Epicatequina (EPI) y Procianidinas B₁, B₂ y C₁ (PCN). Con muestras de mazorca y placenta de cacao, de la variedad Nacional y CCN-51, se obtuvo a través del método Samaniego [56]:

1. Para ello se pesó 0,3g de cada muestra por separado en tubos de centrifuga de 15 mL y agregar 5 mL de solución extractora, compuesta por metanol/agua/ácido fórmico (70/30/0.1, v/v/v).
2. Luego, las muestras fueron llevadas a un proceso de extracción o concentrado, combinando agitación, inmersión en baño ultrasónico y centrifugación. Por lo que se agitó durante 1 min en un Mistral Multi-Mixer (Melrose Park, EE.UU.).
3. Posteriormente, la muestra se colocó en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos, y por consiguiente fue llevado a centrifugación durante 10 min mas a 5500 rpm (2706 xg) en una centrifuga refrigerada (5°C) marca división Damon/IEC (Needham Hts, MA, EE. UU.).
4. El sobrenadante que se obtuvo por cada ciclo, se procedió a trasvasar en un matraz aforado de 25 mL. Este proceso se repitió 3 veces más y la muestra se completó con la solución de extracción.
5. Luego, el extracto se procedió a filtrar a través de una membrana Millipore. PVDF de 0,22 µm y se coloca en un vial con tapón de rosca para su posterior análisis.

3.6.4.2. Teobromina (TBR) y Cafeína (CAF).

Para determinar Teobromina (TBR) y Cafeína (CAF) se pesaron muestras de 0.3g de mazorca y placenta de cacao [56].

1. Al extraer metilxantinas, las muestras se calentaron durante 30 min, con el fin de reducir el 50 % de la muestra en 100 mL de agua bidestilada hasta que el volumen se reduce a la mitad (50 mL).

2. Luego, se agregó 1 mL de solución de Carrez 1 (15% p/v de hexacianoferrato de potasio) y Carrez 2 (30% p/v de sulfato de zinc) en ambas muestras de mazorca y placenta de cacao.
3. El extracto obtenido se filtró inmediatamente a través de un papel filtro Whatman No. 4 en un matraz volumétrico de 100 mL. El extracto una vez frío se completó al volumen indicado usando agua bidestilada.
4. Para la identificación y cuantificación se tomó una alícuota del extracto a través de una membrana de PVDF Millipore de 0,22 μm y se coloca en un vial con tapón de rosca para el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

3.6.5. Identificación de perfiles cromatográficos.

3.6.5.1. Perfiles de polifenoles y flavonoides.

La determinación del contenido de flavan-3-ols; fue realizado por el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la serie 1100/1200 de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania), con detector DAD (280 nm).

1. Para la separación se utilizó una columna Agilent Eclipse XDB C18 (250 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μm).
2. El análisis, se inyectó 20 μL de muestra en el equipo (auto inyector G1329A) y se eluyó, a un caudal de 0,8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ usando dos fases móviles a una temperatura 35°C. La fase móvil A estuvo compuesta por acetonitrilo/agua/ácido fórmico (99/0,8/0,2 v/v/v) y fase móvil B por acetonitrilo.
3. Para la elución de la fase móvil A, se llevó a cabo en isocrático; mientras que la fase móvil B se diluyó en un gradiente de 5 a 100% durante 75 min. La identificación y cuantificación se realizó por comparación usando estándares de CAT, EPI, PCN B₂, y C₁, los resultados fueron expresados en $\text{mg} \cdot \text{g}$ de flavan-3-oles de mazorca y placenta de cacao, respectivamente [57].

3.6.5.2. Perfil de metilxantinas.

Para identificar el contenido de metilxantinas (Teobromina y Cafeína) se realizó por medio del equipo de Cromatografía HPLC (Agilent technologies serie 1100/1200; Waldbronn, Alemania), con la ayuda de un Detector DAD (273nm).

1. La separación se llevó a cabo usando una columna Agilent Zorbax. 42 SB C18 (150 mm x 4,6 mm, con tamaño de partícula de 5 μ m).
2. Para el análisis, se inyectó 20 μ L de muestra en el equipo (auto inyector G1329A) y se eluyó, a un caudal de 1 mL/min con una fase móvil compuesta por una solución de metanol en agua al 25% (v/v) durante 15 min por muestra.
3. La temperatura del horno de la columna (G1316A) fue de 25°C. El equipo se controló por el software Chemstation (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania).
4. Para la identificación y cuantificación de metilxantinas se realizó en comparación de su estándar. Los resultados fueron expresados en gramos por 100g (%) de TBR y CAF, en muestras de mazorca y placenta de cacao [57].

3.7. Tratamiento de los datos.

El tratamiento estadístico de los datos y el análisis de correlación canónica se realizó con soporte de software libre. Mediante la prueba "t" de Student, se determinó si existe un efecto de la variedad de cacao (Clon de CCN-51 y Complejo NacionalxTrinitario) sobre el perfil de polifenoles y flavonoides residuos de la industria del cacao. Mientras que el análisis de correlación canonical se utilizó para identificar los compuestos responsables de la actividad antioxidante en los coproductos de la cadena de beneficios del cacao (mazorca y placenta).

3.7.1. Variables.

Variable Independiente: Variedades de cacao (mazorca y placenta).

- Cacao CCN-51
- Cacao “Complejo NacionalxTrinitario”

Variable Dependiente: Perfil de compuestos fenólicos y metilxantinas.

- Polifenoles
- Flavonoides.
- Metilxantinas

3.8. Recursos humanos y materiales.

3.8.1. Recursos humanos.

Para llevar a cabo este estudio se requirió de los siguientes factores a utilizar; recursos humanos, trabajos experimentales, bibliográficos, análisis, asesoría general y revisión y corrección.

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc. Directora del proyecto de Investigación - UTEQ.

Dr. Iván Samaniego Maigua. PhD. Codirector del proyecto de Investigación - INIAP.

Ing. Christian Vallejo Torres, MSc. Académico de Apoyo - UTEQ.

Srta. Chuez Sabando Katherine Pamela. Estudiante - Tesista.

3.8.2. Materiales.

3.8.2.1. *Materiales.*

- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL.
- Vasos de precipitación de 50, 80 y 100 mL.
- Gradillas.
- Guantes de nitrilo pack/50.
- Mascarillas.
- Tubos de ensayo.
- Tubos Eppendorf.
- Tubos de centrífuga de 15y 20 mL.
- Espátula.
- Agitador magnético con calentador.
- Pissetas.
- Frascos de vidrio color ámbar.
- Papel filtro.
- Papel aluminio.
- Papel Parafilm.
- Puntas de micropipeta de 100-1000 μ L.

- Puntas de micropipeta de 1-10 mL.
- Membrana Millipore PVDF de 0,22 μm .
- Viales de 1.5mm.
- Frascos plásticos de 250 mL, para muestras.
- Columna Agilent Zorbax SB C18+
- Balón volumétrico de 100 mL.

3.8.2.2. Reactivos.

El tipo de solvente que aplicó para la identificación analítica son los grados analíticos (98%) y grado cromatográfico (99,9%) se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania).

- Agua Bidestilada.
- Fase móvil.
- Solución extractora.
- Estándares de Catequina.
- Estándares de Epicatequina.
- Estándares de Procianidinas C₁ y B₂.
- Cafeína.
- Teobromina.
- Hexacianoferrato de Potasio trihidratado.
- Sulfato de zinc dihidrato.

3.8.2.3. Equipos.

- Cronómetro.
- Refrigerador.
- Balanza analítica 0,1g.
- Baño ultrasónico.
- Centrífuga.
- Agitador Vortex.
- Placa agitadora.
- Micropipeta Finn timer 20-200 μL .
- Micropipeta Finn timer 100-1000 μL .

- Micropipeta Labnet de 1-10 mL.
- Micropipeta Finnpipette de 1-10 mL.
- Micropipetas 100-1000 μ L y 1-10 mL.
- HPLC Agilent 1100/1200 Series.
- Auto inyector (G1329A).
- Bomba binaria (G1312A).
- Horno de columna (G1316A).
- Detector de arreglo de Diodos (DAD G1315D).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4. Resultados.

4.1. Perfil de polifenoles.

4.1.1. Adaptación de las condiciones del método.

La identificación y cuantificación del perfil de polifenoles se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) adaptada a un detector de arreglo de diodos DAD. Las condiciones cromatográficas (Tabla 9) empleadas para la identificación y cuantificación de compuestos bioactivos en residuos de la cadena de beneficio del cacao se basó en el manual de métodos para análisis de cacao desarrollado por Yépez [51]. Donde el autor estableció el tipo de columna, la temperatura del horno, el flujo, la gradiente de elución y el tipo de fases móviles, la longitud de onda y el tipo de detector.

Tabla 9. Condición cromatográfica para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía HPLC.

Parámetro	Condición
Columna	C18 (4,6 x 250 mm), tamaño de partículas de 5µm.
Temperatura de columna:	35 °C
Flujo:	0,8 mL/min.
Volumen de inyección:	20 mL
Detector:	DAD, longitud de onda 280 µm.
Tiempo de cromatografía:	75 minutos.
Fase móvil:	Eluyente A: Agua/Acetonitrilo/Ácido fórmico (99:0,8;0,2 v/v/v).
	Eluyente B: Acetonitrilo grado HPLC.
Gradiente de elución:	5 a 100% de B en 75 minutos.

Fuente: [51].

4.1.2. Perfil cromatográfico.

4.1.3. Curva de calibración.

Para la determinación del perfil de polifenoles en muestras de residuos o subproductos de cacao (mazorca y placenta), se aplicó dos métodos de identificación. El primer método consistió en la determinación del perfil de compuestos fenólicos empleando estándares de compuestos típicos de la almendra de cacao (Catequina, Epicatequina, Procianidina B₁, B₂, C₁). En el Figura 26, se muestra la curva de calibración del estándar la muestra residual de mazorca (Epicatequina), empleadas para la cuantificación de compuestos fenólicos de cada una de las muestras en dicho estudio.

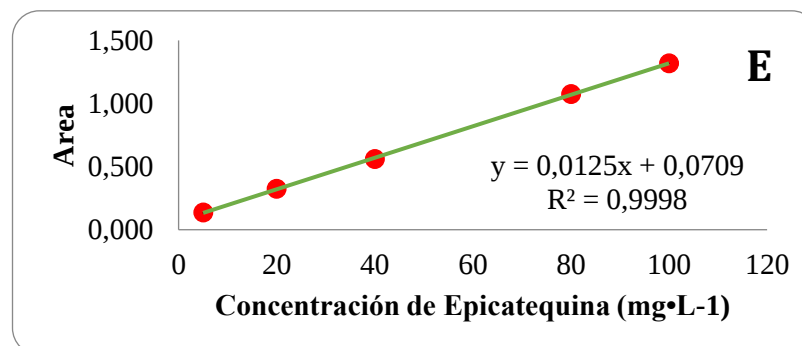
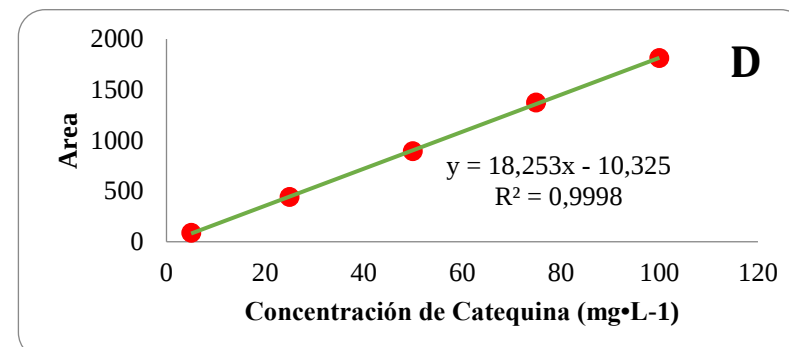
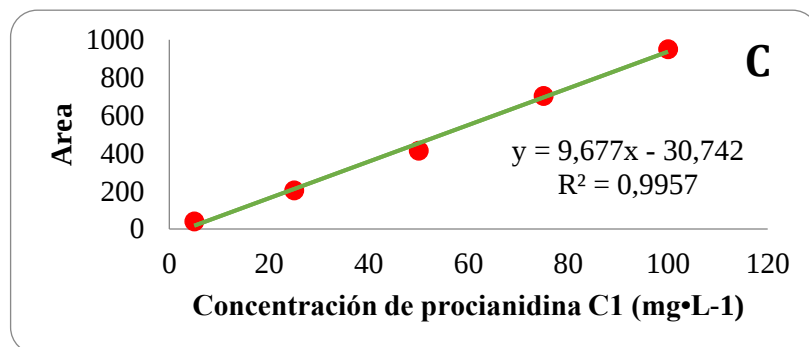
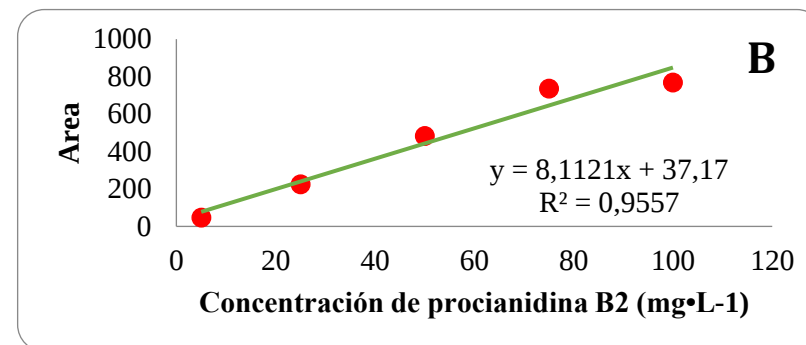
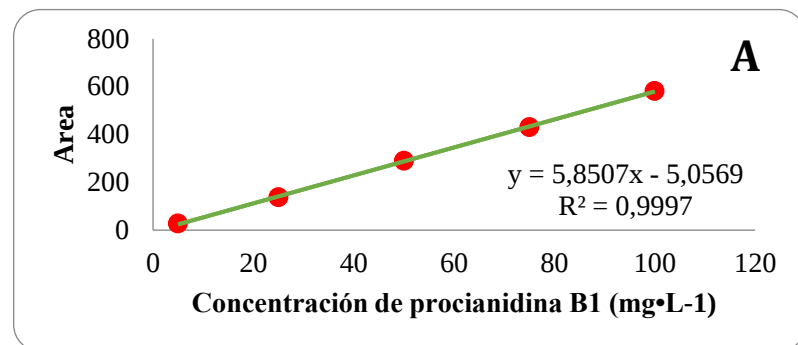


Figura 26. Curva de calibración promedio para la determinación del perfil de compuestos fenólicos por HPLC: PCN B1 (A), PCN B2 (B), PCN C1 (C), CAT(D), EPI (E).

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 26, existe una alta correlación entre la concentración de los estándares Catequina ($R^2=0.9998$), Epicatequina ($R^2=0.9998$), Procianidina B₁ ($R^2=0.9997$), Procianidina B₂ ($R^2=0.9557$), Procianidina C₁ ($R^2=0.9957$), y las áreas bajo la curva, permitiendo cuantificar con exactitud y precisión el perfil de polifenoles en las muestras de placenta y mazorca de cacao.

4.1.4. Cuantificación del perfil de polifenoles.

Los compuestos bioactivos se constituyen del 12-18%, siendo uno de los fitoquímicos mayormente detectados en las almendras de cacao, por lo que se derivan del ácido fenólico, flavonoides, derivados de aminoácidos y otros compuestos polares. Sin embargo, estos fitoquímicos han mostrado múltiples beneficios, incluido el potencial antioxidante, la prevención de la diabetes tipo 2 mellitus, actividad antimicrobiana, riesgo reducido de enfermedades cardiovasculares y presión arterial más baja, y actividad antimicrobiana [14].

La valorización residual proveniente del cacao, sus residuos siendo parte de un recurso renovable que está siendo aprovechado tanto la ciencia como la industria se han centrado en encontrar nuevas tecnologías rentables que permitan recuperar los fitoquímicos que puedan reducir los tiempos de extracción, el consumo de energía y el impacto ambiental [58]. Sin embargo, estos mismos residuos provenientes del cacao logran adquirir compuestos beneficios para la salud siendo rico en fibra, lignina y antioxidantes bioactivos (polifenoles), aprovechados para la producción de biocombustibles y otros biopolímeros [59].

Placenta de cacao.

En la Figura 27 se presentan el perfil de compuestos fenólicos identificados en placenta de cacao.

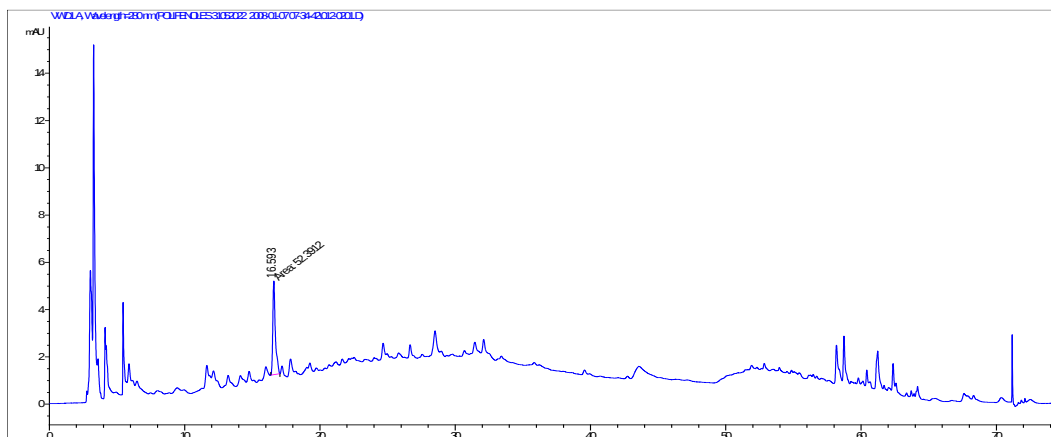


Figura 27. Identificación del perfil de componentes fenólicos en placenta de cacao.

De acuerdo con el perfil cromatográfico presentado en la Figura 27, la placenta de cacao es rica en compuestos fenólicos diferentes a los identificados en las almendras (Catequina, Epicatequina y Procianidina B₁, B₂ y C₁), mucilago (Catequina, Epicatequina y Procianidina B₁, B₂ y C₁) y cascarilla de cacao (Catequina y Epicatequina). Por lo que, para la identificación y cuantificación de los componentes bioactivos de este residuo se trabajó con la metodología de estándar externo como se muestra en la Figura 28.

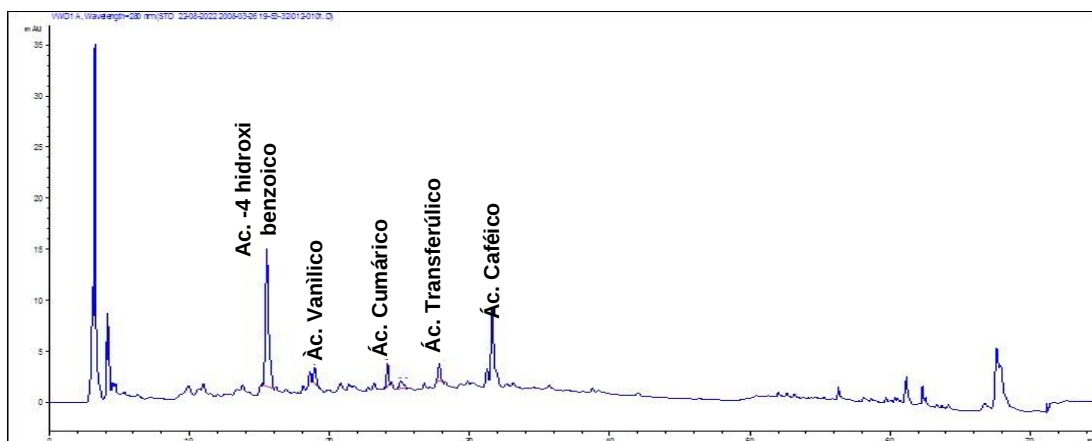


Figura 28. Identificación del perfil de componentes fenólicos en placenta de cacao por el método de estándar externo.

A diferencia de las almendras y otros residuos de cacao, la placenta es rica en Ácido-4 hidroxí benzoico, Ácido Vanílico, Ácido Cumárico, Ácido Cafeico y Ácido Transferúlico. Según Mellinas y colaboradores [60] el perfil fenólico de los residuos de cacao depende de diferentes factores como variedad, proceso de recolección y tostado, técnicas de extracción de los analitos de interés. Por lo que, al comparar los resultados de esta investigación, con el trabajo desarrollado por Hernández-Hernández y colaboradores [61] se determinó que dependiendo del tipo de residuos puede variar el perfil de polifenoles identificados en las muestras. Estos autores reportaron un perfil de polifenoles rico en Ácido cafeico, Catequina, Epicatequina, Epigallocatequina, y cuatro compuestos bioactivos no identificados en cotiledón (mucilago de cacao) de muestras procedentes del banco nacional de germoplasma de México para genotipos de diferentes orígenes.

A pesar de que la placenta y el mucilago proceden de la parte interna del fruto del cacao, el perfil de compuestos bioactivos es distinto, esto puede deberse a que el mayor componente fenólico en el cacao son los flavonoides como: Catequina, Epicatequina y Procianidina [42]. Sin embargo, la placenta fue extraída antes del proceso fermentativo del cacao en baba, por lo que carece del perfil de compuestos bioactivos presentes en el mucilago exudado de cacao.

Estos fitonutrientes migran desde la almendra hacia el cotiledón generando un enriquecimiento de este residuo, por esta razón, el mucilago presenta los mismos compuestos fenólicos de las almendras de cacao [8] en una menor concentración [42].

Mazorca de cacao.

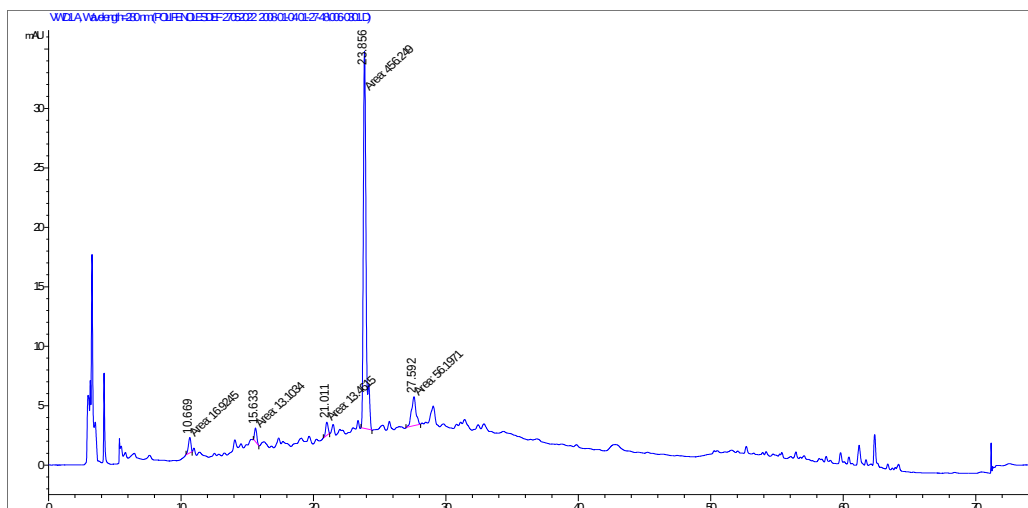


Figura 29. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao.

De acuerdo con el perfil cromatográfico presentado en la Figura 29, la mazorca de cacao es rica en compuestos fenólicos diferentes a los identificados en la mazorca (Teobromina y Cafeína). Por lo que, para la identificación y cuantificación de los componentes bioactivos de este residuo se trabajó con la metodología de estándar como se muestra en la Figura 30.

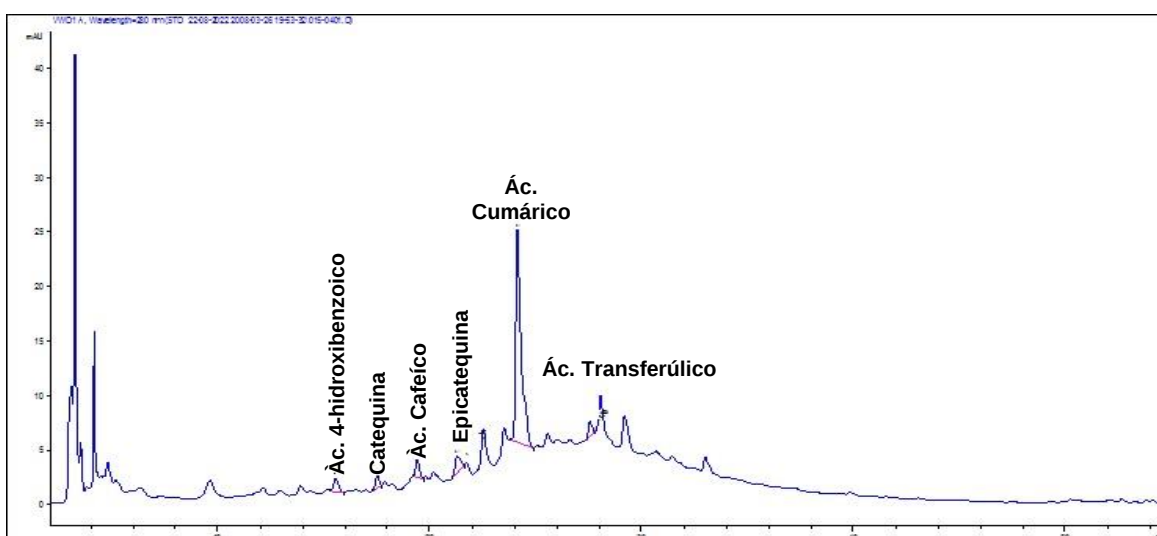


Figura 30. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao por el método de estándar externo.

4.1.5. Cuantificación de polifenoles.

Placenta.

En la Tabla 10, se presenta la concentración de los componentes fenólicos identificados en placenta de cacao.

Tabla 10. Concentraciones del perfil de componentes fenólicos de placenta de cacao.

Muestra	Componentes Fenólicos	Concentración (mg/100g)			
		NacionalxTrinitario		Clon de CCN-51	
Placenta	Acido-4 hidroxibenzoico	45,9678 ± 25,41	a	10,028 ± 25,41	b
	Ácido Vainílico	4,087 ± 2,89	a	0 ± 2,89	b
	Ácido Cumarico	0,875 ± 0,36	a	0,361 ± 0,36	b
	Acido Cafeico	0,606 ± 0,97	a	1,985 ± 0,97	b
	Ácido Transferúlico	2,076 ± 1,31	a	0,219 ± 1,31	b

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 10, la placenta de cacao, presenta un perfil de compuestos fenólicos similar al orujo de uva (ácido vainílico, p-cumárico), residuo de café molido filtrado y orujo de tomate en cuanto al contenido de ácido vainílico (17.2 a $31.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) y p-cumárico (21.3 ± 0.4 a $81 \pm 6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), siendo superior a estos con valores de $0,875 \pm 0,36$ y $0,361 \pm 0,36 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para ácido cumárico y $4,087 \pm 2,89$ y $0 \pm 2,89 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ac vainílico. Sin embargo, estos residuos presentan otro tipo de compuestos fenólicos como: Ácido gálico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido elágico, ácido cinámico [62].

Por lo tanto, podríamos confirmar que existe un efecto de la variedad y la zona de procedencia de los residuos de cacao sobre la concentración de fitonutrientes presentes en estas matrices, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las muestras de mazorca del Complejo NacionalxTrinitario y el Clon CCN-51, para los contenidos de Acido-4 hidroxibenzoico ($p=0,0002541$), Ácido Vainílico ($p=0,0000289$), Acido Cumarico ($p=0,0000036$), Acido Cafeico ($p=0,0000097$) y Ácido Transferúlico ($p=0,0000131$) a un nivel de confianza del 95%.

Mazorca.

En la Tabla 11, se muestra la concentración de componentes fenólicos identificados en la mazorca de cacao.

Tabla 11. Concentraciones del perfil de componentes fenólicos de mazorca de cacao.

Muestra	Componentes Fenólicos	Concentración (mg/100g)			
		NacionalxTrinitario		Clon de CCN-51	
Mazorca	Acido-4 hidroxibenzoico	3,796 ± 0,12	a	3,967 ± 0,12	b
	Ácido Cumárico	1,985 ± 0,04	a	2,048 ± 0,04	b
	Acido Cafeico	38,975 ± 11,86	a	22,201 ± 11,86	b
	Ácido Transferúlico	0,878 ± 0,74	a	1,927 ± 0,74	b
	Catequina	5,061 ± 2,65	a	8,812 ± 2,65	b
	Epicatequina	0 ± 9,93	a	14,056 ± 9,93	b

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 11. Según el estudio de Valadez y colaboradores [63]. Indica que la mazorca de cacao, presenta un perfil de compuestos fenólicos por medio del método de secado con aire caliente (Catequina, Epicatequina, Ácido cumárico), secado por microondas (Catequina, Epicatequina, Ácido cumárico), secado en frío (Catequina, Epicatequina, Ácido cumárico), en cuanto al contenido de Catequina ($844.8 \pm 6.6b$ a $2288.8 \pm 16.9c$ mg• 100g⁻¹) y Epicatequina ($1589.5 \pm 54.4b$ a $3699.2 \pm 64.7d$ mg• 100g⁻¹), siendo superior a estos con valores de $5,061 \pm 2,65a$ y $8,812 \pm 2,65b$ mg• 100g⁻¹ para Catequina, $0 \pm 9,93a$ y $14,056 \pm 9,93b$ mg• 100g⁻¹ para Epicatequina, $1,985 \pm 0,04a$ y $2,048 \pm 0,04b$ para Ácido cumárico. Sin embargo, estos residuos presentan otro tipo de compuestos fenólicos como: Catequina, Quercetina, Epicatequina, Ácido gálico, Ácido cumárico, Ácido protocatequico.

En cuanto a los resultados de la Tabla 11, de la mazorca de cacao, presenta un perfil de compuestos fenólicos por medio del método de secado con Aire caliente (Catequina, Epicatequina, Ácido cumárico), Secado por microondas (Catequina, Epicatequina, Ácido cumárico), Secar en frío (Catequina, Epicatequina, Ácido cumárico), de mazorca de cacao en cuanto al contenido de Catequina ($867.9 \pm 28.7b$ a $2288.8 \pm 16.9c$ µg/g), Epicatequina ($1589.5 \pm 54.4b$ a $3699.2 \pm 64.7d$ µg/g) y Ácido cumárico ($504.9 \pm 0.8b$ a $504.9 \pm 0.8b$ µg/g) siendo superior a estos con valores de $5,061 \pm 2,65$ y $8,812 \pm 2,65$ µg/g para Catequina, $0 \pm 9,93$ y $14,056 \pm 9,93$ µg/g para Epicatequina, $1,985 \pm 0,04$ y $2,048 \pm 0,04$ para Ácido cumárico. Sin embargo, estos residuos presentan otro tipo de compuestos fenólicos como: Catequina, Quercetina, Epicatequina, Ácido gálico, Ácido cumárico, Ácido protocatequico [63].

De acuerdo con los resultados obtenidos por Hernández-Hernández y colaboradores [61], el cotiledón y la cascarilla de cacao presentan diversos compuestos fenólicos dentro de su composición fitoquímica como Ácido Cafeico (traces*), Catequina (1.02 ± 0.01 a 6.16 ± 0.14 mg $\cdot$ 100g $^{-1}$) y Epicatequina (6.93 ± 0.09 a 17.70 ± 0.03 mg $\cdot$ 100g $^{-1}$), cuyos valores varían dependiendo del método de extracción. Estos autores consideran que la concentración del perfil de componentes fenólicos se ve afectado por el tipo de método de extracción y el origen del genotipo de cacao estudiado hallando una amplia variación entre 25 muestras de cotiledón de cacao comercial de origen mexicano, peruano, colombiano y ecuatoriano. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran dentro del rango de concentración reportado por Hernández-Hernández y colaboradores para Catequina (1.02 ± 6.16) y Epicatequina (6.93 ± 17.70). Por el contrario, el ácido cafeico fue superior en las muestras de mazorca de cacao del Complejo NacionalxTrinitario ($38,975 \pm 11,86$ mg $\cdot$ 100g $^{-1}$) y el Clon de CCN-51 ($22,201 \pm 11,86$ mg $\cdot$ 100g $^{-1}$) procedentes de la Costa pacífica del Ecuador (Mocache, Los Ríos, Ecuador).

De acuerdo con el trabajo presentado por Samaniego y colaboradores [57] el contenido de monómeros de flavan-3-ols y procianidinas varían de acuerdo con el origen geográfico, el proceso postcosecha, las condiciones climáticas, época de cosecha y los métodos de extracción. Por lo que, al comparar los resultados de este estudio con el trabajo desarrollado por Valadez-Carmona [63] se determinó que el contenido de Catequina (86.79 ± 28.7 mg $\cdot$ 100g $^{-1}$) Epicatequina (158.95 ± 54.4 mg $\cdot$ 100g $^{-1}$) y Ácido cumárico (50.49 ± 0.8 mg $\cdot$ 100g $^{-1}$) fueron superiores a los obtenidos en este estudio. Esto puede deberse a que estos autores emplearon acetona /agua/ ac. acético (70:29.5:0.5; v/v/v) como medio de extracción y el secado se realizó con aire caliente a 60 °C durante 24 horas empleando muestras de mazorca de cacao procedentes de Tapachula, Chiapas, México. Por lo tanto, podríamos confirmar que existe un efecto de la variedad y la zona de procedencia de los residuos de cacao sobre la concentración de fitonutrientes presentes en estas matrices, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las muestras de mazorca del Complejo NacionalxTrinitario y el Clon CCN-51, para los contenidos de Ácido-4 hidroxibenzoico ($p=0,0000931$), Ácido Cumarico ($p=0,00$), Ácido Cafeico ($p=0,0000948$), Ácido Transferúlico ($p=0,0000151$), Catequina ($p=0,0000424$) y Epicatequina ($p=0,0000113$) a un nivel de confianza del 95%.

4.2. Perfil de metilxantinas.

4.2.1. Adaptación de las condiciones del método.

La identificación y cuantificación del perfil de metilxantinas se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) adaptada a un detector UV-VIS. Las condiciones cromatográficas (Tabla 12) empleadas para la identificación y cuantificación de compuestos bioactivos en residuos de la cadena de beneficio del cacao basándose en el manual de métodos para análisis de cacao desarrollado por Samaniego y colaboradores [56]. Donde el autor estableció el tipo de columna, la temperatura de columna, el tiempo de cromatografía, el flujo, volumen de inyección y el tipo de fase móvil, la longitud de onda y el tipo de detector.

Tabla 12. Condicion cromatografica para la identificacion y cuantificacion de compuestos fenolicos por cromatografia HPLC.

Parámetro	Condición
Columna	STR ODS II (150 x 4,6 mm), tamaño de partículas de 5µm.
Temperatura de columna:	25 °C
Flujo:	1 mL/min.
Volumen de inyección:	20 µL
Detector:	UV-VIS, longitud de onda 273 nm.
Tiempo de cromatografía:	15 minutos.
Fase móvil:	Metanol/Agua/ (25:75 v/v).

Fuente: [56].

4.2.2. Perfil cromatográfico.

4.2.3. Curva de calibración.

Para la determinación del perfil de metilxantinas en muestras de residuos de cacao (mazorca y placenta), se utilizó un método de identificación. El segundo método consistió en determinar el perfil de compuestos alcalinos empleando estándares de compuestos típicos de la almendra de cacao (Teobromina y Cafeína). En el Figura 31, se muestran las curvas de calibración obtenidas por el estándar la muestra residual de mazorca, empleadas para la cuantificación de compuestos alcalinos de cada una de las muestras en dicho estudio.

De acuerdo a los resultados demostrados en la Figura 31, existe una alta correlación entre la concentración de los estándares Teobromina ($R^2=0.9998$), Cafeína ($R^2=0.9998$) y las áreas bajo la curva, permitiendo cuantificar con exactitud y precisión el perfil de metilxantinas en las muestras de placenta y mazorca de cacao.

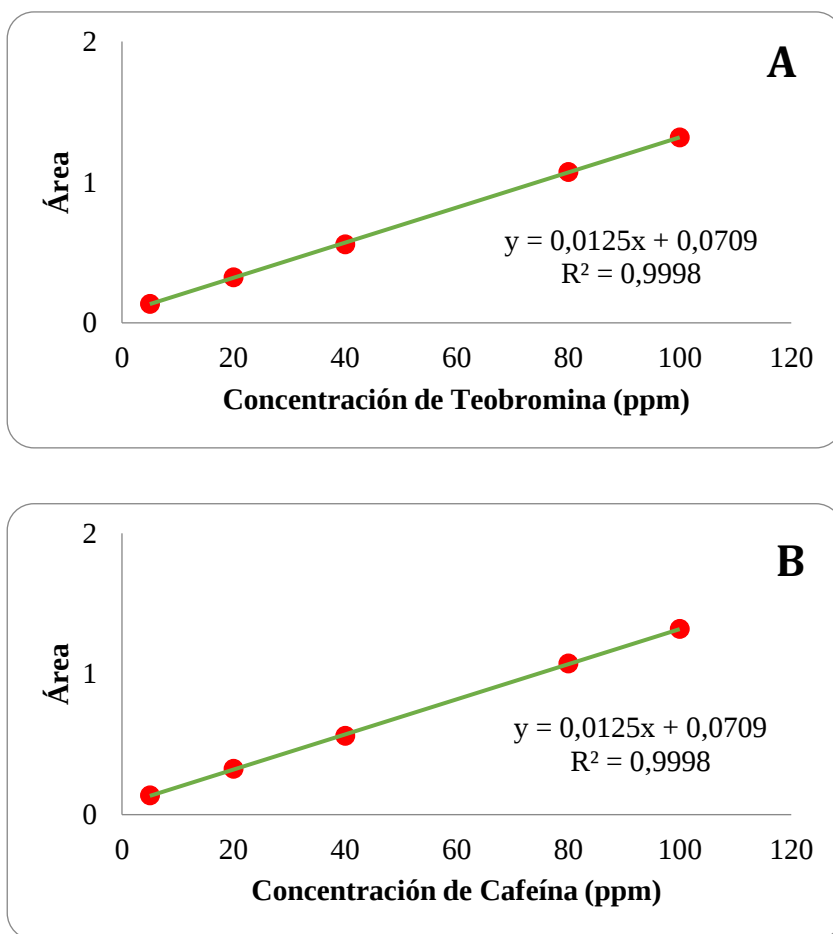


Figura 31. Curva de calibración promedio para la determinación del perfil de compuestos alcalinos por HPLC: TEO (A), CAF (B).

4.2.4. Cuantificación del perfil de metilxantinas.

Las metilxantinas son productos naturales generalmente ligados a una salud estilo de vida. Por lo que, las metilxantinas generan beneficios para la salud, principalmente teobromina y cafeína, que incluye la prevención y/o disminución del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, y enfermedades del tracto respiratorio. Efectos como psicoestimulantes, sobre el sueño y también se ha destacado la resistencia a la insulina [43].

Algunos estimulantes se derivan de las metilxantinas e incluyen cafeína, teobromina y teofilina. La cafeína como alcaloide se encuentra en cantidades variables en las semillas, hojas y frutos de algunas plantas, donde actúa como un pesticida natural que paraliza y mata a ciertos insectos que se alimentan de las plantas. Está más comúnmente consumido como infusiones extraídas de los granos de la planta del café y las hojas de un té, así como de varios alimentos y bebidas que contienen productos derivados de la nuez de cola. La teobromina es un alcaloide amargo de la planta de cacao, y se encuentra en el chocolate, así como en una serie de otros alimentos. La teofilina, también conocida como dimetilxantina, se encuentra naturalmente en los granos de té y cacao. como miembro de la familia de las metilxantinas, tiene similitud estructural y farmacológica con la cafeína y la teobromina [64].

Hoy en día los subproductos agroindustriales secundarios más abundantes del cacao, alrededor del 80% de la fruta se descarta como biomasa residual, incluidas las cáscaras de las mazorcas de cacao, las cascarillas y mucilago de cacao. Si bien la materia orgánica presente en los residuos agroindustriales es fuente de componentes valiosos, pocas tecnologías son capaces de ofrecer seguridad en cuanto al proceso de recuperación, purificación y concentración de estos compuestos químicos [65].

Por lo tanto, la comunidad científica, las industrias, los gobiernos y la sociedad sobre las aplicaciones sostenibles, los últimos avances y las tendencias en la valorización de los residuos agroindustriales para el desarrollo de nuevos productos, destacando las nuevas posibilidades para el progreso de la producción sostenible [65].

Placenta de cacao.

En la Figura 32 se presentan el perfil de compuestos alcalinos identificados en placenta de cacao.

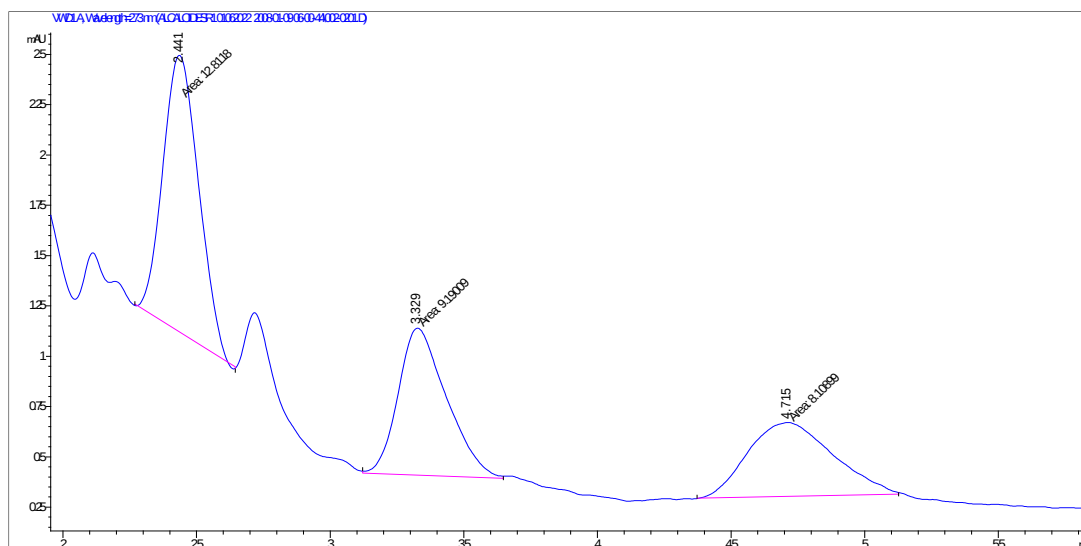


Figura 32. Identificación del perfil de componentes alcalinos en placenta de cacao.

De acuerdo con el perfil cromatográfico presentado en la Figura 32, la placenta de cacao es rica en compuestos fenólicos diferentes a los identificados en la placenta (Teobromina, Teofilina y Cafeína). Por lo que, para la identificación y cuantificación de los componentes bioactivos de este residuo se trabajó con la metodología de estándar como se muestra en la Figura 33.

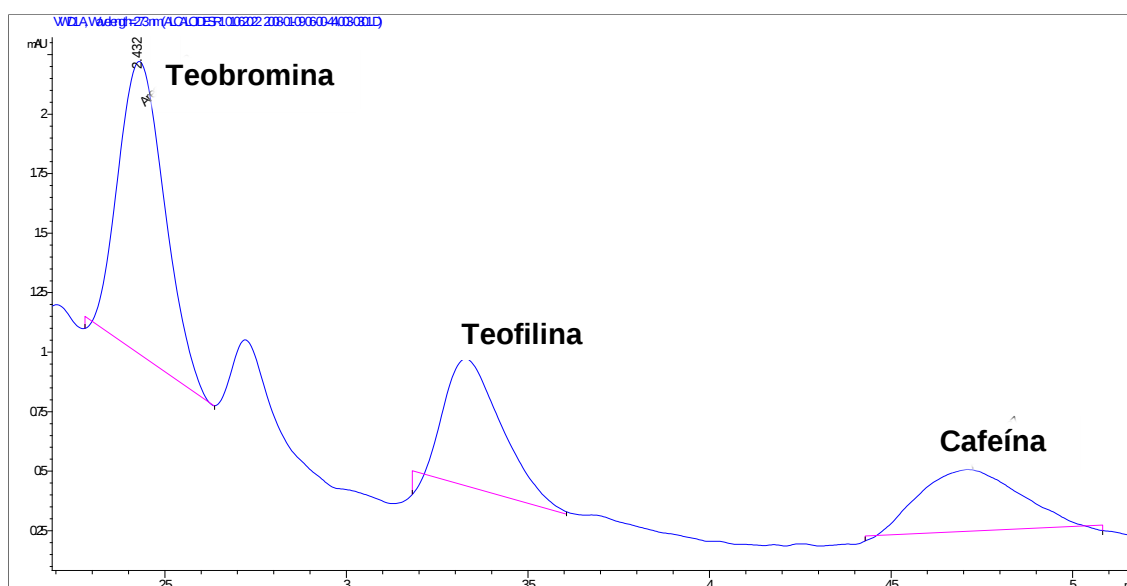


Figura 33. Identificación del perfil de componentes alcalinos en placenta de cacao por el método de estándar.

En comparación de almendras con residuos de cacao, la placenta es rica en Teobromina, Teofilina y Cafeína. Según Brunetto y colaboradores [66] el perfil de alcaloides depende de factores como el genotipo, el manejo agronómico, el suelo, las condiciones climáticas y, lo más importante, la tecnología postcosecha. De esta manera, la calidad del cacao el sabor y el aroma de los granos dependerán de las habilidades y la buena atención de los técnicos a cargo. Por ello, es necesario evaluar parámetros físicos, químicos y organolépticos, que permitan determinar la calidad del cacao en cuanto al genotipo y el medio ambiente. Por lo que, es importante analizar las metilxantinas (teobromina, teofilina y cafeína), porque sus niveles dependen del genotipo y afectan el sabor de los granos de cacao.

Por otra parte, en la teobromina, la teofilina y la cafeína, la solubilidad se relaciona con la temperatura, lo que favorece a otros compuestos dentro de ellos se encuentran los pigmentos. Estos compuestos están presentes durante el procedimiento de extracción (filtrado) interfiriendo en el análisis HPLC, pudiendo reducir la vida útil de la columna analítica si no fuera eliminado antes de la inyección en el sistema HPLC. Con el objetivo de obtener más selectividad, para obtener recuperaciones cuantitativas de analitos durante la etapa de extracción, la naturaleza y composición se optimizó la fase móvil de extracción compuesta por Metanol al 1% en agua (v/v) a un caudal de 0,8 ml/min durante 3 min. La mayor parte de la matriz de la muestra había sido eluido de la precolumna; sin embargo, aún quedaban teobromina, teofilina y cafeína. Es importante señalar que la adición de una cantidad limitada de un modificador orgánico, como el metanol, para el lavado líquido es muy útil para mejorar la extracción selectividad y obtener altas recuperaciones de los analitos [66].

Según Cardoso y colaboradores [67]. En cuanto a concentraciones de teobromina (TB) y cafeína (CF), se estudió la técnica, y después de determinar las condiciones óptimas, se trazaron las curvas analíticas. construido y los límites de detección y cuantificación calculados como $0.027 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $0,093 \mu\text{mol L}^{-1}$ para Cafeína y $0,025$ y $0,085 \mu\text{mol L}^{-1}$ para Teobromina. Donde se llevó a cabo pruebas de repetibilidad (entre días) y los valores de desviación estándar relativa estuvieron por debajo de 2,51% y 6,50%, respectivamente. Se llevaron a cabo estudios de interferencia y no hubo potencial. Debido a la baja concentración de Cafeína en la muestra de cacao amazónico, se desarrolló una celda electroquímica miniaturizada producida en una impresora 3D. Basado en el resultado, los errores relativos fueron inferiores al 10% y los valores críticos para las pruebas F y t fueron inferiores a los tabulados al 95% de nivel de confianza, con $n = 3$. Las recuperaciones oscilaron entre 80% y 115% [67].

Mazorca de cacao.

En la Figura 34 se presentan el perfil de compuestos alcalinos identificados en mazorca de cacao

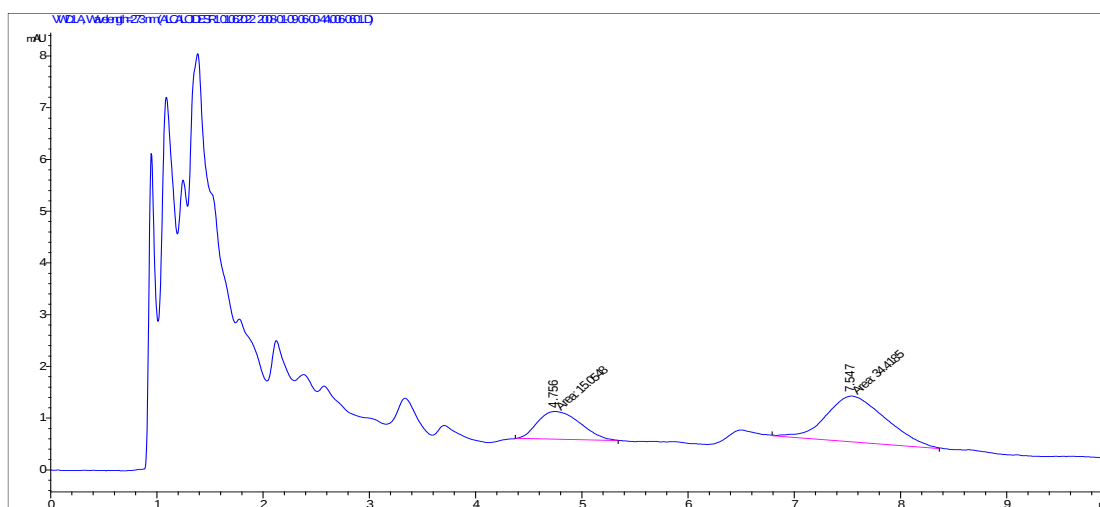


Figura 34. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao.

De acuerdo con el perfil cromatográfico presentado en la Figura 34, la mazorca de cacao es rica en compuestos fenólicos diferentes a los identificados en la mazorca (Teobromina y Cafeína). Por lo que, para la identificación y cuantificación de los componentes bioactivos de este residuo se trabajó con la metodología de estándar como se muestra en la Figura 35.

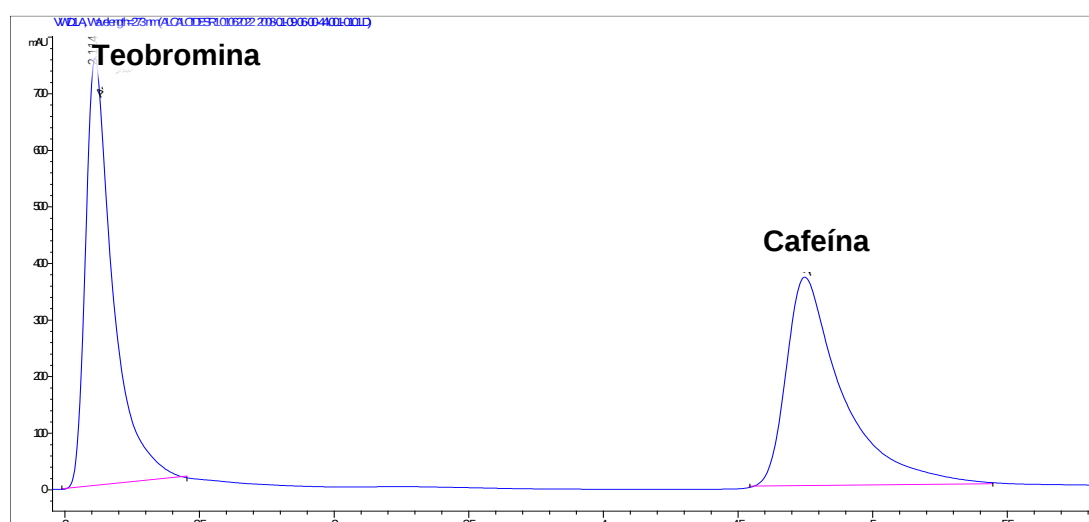


Figura 35. Identificación del perfil de componentes alcalinos en mazorca de cacao por el método estándar.

Para la cuantificación de las metilxantinas se empleó la variedad de cacao amazónico, donde la Cafeína y Teobromina se aisló en muestras fermentadas y no fermentadas usando cromatografía preparativa. Determinando que la cuantificación de los alcaloides fue realizada por el método Hplc-Pad. Por lo que, la Teobromina y la Cafeína en el cacao son compuestos que presentaron tiempos de retención similares a los de las soluciones estándar, con tiempos de retención (tR) de 6,9 y 11,8 min, respectivamente. Sin embargo, existe poca investigación electroanalítica en muestras de cacao y, para lo mejor del conocimiento de los autores, reconocimiento, ninguno para determinar Teobromina y Cafeína con ola cuadrada Voltamperometría (SWV) en muestras de cacao amazónico fermentado y no fermentado [66].

Sin embargo, estas sustancias muestran varios efectos fisiológicos en diferentes partes del cuerpo, incluyendo el centro nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, respiratorio y renal, y estos compuestos también pueden causar depresión e hiperactividad. Son productos químicos muy comunes en la dieta humana, como el cacao, los téis, y productos de chocolate. Por lo tanto, es importante ensayar cafeína, teobromina y teofilina, porque sus niveles dependen del genotipo y afectan el sabor de los alimentos y bebidas.

Según un estudio realizado por Okiyama y colaboradores [68]. Indica que la cáscara de cacao es un coproducto de la industria del cacao que se utiliza principalmente como combustible para calderas, pero con aplicaciones secundarias como fertilizante y en la alimentación animal. Por lo que, este material es rico en flavanoles y alcaloides. Para la determinación de los datos de la cinética de extracción, se utilizó el método Dmac, mientras que cada compuesto fue cuantificado utilizando un análisis Uplc-Ms/Ms. El modelo de Peleg aplicado a la descripción de datos de extracción proporcionó una concordancia razonable con los resultados experimentales, lo que permite su aplicación en modelado y optimización de la extracción sólido-líquido de los flavanoles totales del grano de cacao caparazón.

Varios estudios han reportado la actividad antioxidante de sus productos de pigmentos fenólicos y extractos etanólicos o metanólicos. Sin embargo, aunque los efectos antioxidantes de la cáscara de cacao son asociados a sus compuestos fenólicos, no se han realizado estudios en los que Los grupos polifenólicos se analizaron cuantitativamente, mientras que las procianidinas se han descrito cualitativamente [68].

4.2.5. Cuantificación de metilxantinas.

Placenta.

En la Tabla 13, se presenta la concentración de los componentes alcalinos identificados en placenta de cacao.

Tabla 13. Concentraciones del perfil de componentes alcalinos de placenta de cacao.

Muestra	Componentes Alcalinos	Concentración (mg/100g)			
		NacionalxTrinitario		Clon de CCN-51	
Placenta	Teobromina	5.66± 0.37	a	3.10± 0.35	b
	Cafeína	5,10 ± 0.08	a	3,03± 0.02	b

En base a los resultados de la Tabla 13, la placenta de cacao, presenta un perfil de compuestos alcalinos con un contenido menor en muestras de cacao (Cafeína y Teobromina), en cuanto al contenido de Cafeína ($0,9164$ a $1,033 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y Teobromina ($0,9996$ a $1,102 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) estos datos se obtuvieron del estudio basado en muestras de bebidas gaseosas, muestras de té, cacao en polvo y cafeína en polvo, siendo inferior a los valores de $5,10 \pm 0.08$ y $3,03 \pm 0.02 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para Cafeína y 5.66 ± 0.37 y $3.10 \pm 0.35 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para Teobromina. Por lo tanto, estos residuos presentan otro tipo de compuestos alcaloides como: Teobromina, Cafeína y Teofilina [64].

Por lo que, se daría por confirmado que existe un efecto de la variedad y la zona de procedencia de los residuos de cacao sobre la concentración de fitonutrientes presentes en estas matrices, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las muestras de placenta del Complejo NacionalxTrinitario, presentado por contenidos de Teobromina ($p=0,0000037$), Cafeína ($p=0,0000008$), y el Clon CCN-51, obtuvo un contenido de Teobromina ($p=0,0000035$), Cafeína ($p=0,0000002$) con un nivel de confianza del 95%.

Mazorca.

En la Tabla 14, se muestra la concentración de los componentes alcalinos identificados en la mazorca de cacao.

Tabla 14. Concentraciones del perfil de componentes alcalinos de mazorca de cacao.

Muestra	Componentes Alcalinos	Concentración (mg/100g)			
		NacionalxTrinitario		Clon de CCN-51	
Mazorca	Teobromina	2,60± 0.04	a	0,00 ± 0.00	b
	Cafeína	8,22 ± 1.41	a	4.01± 0.79	b

Según los resultados que indica la Tabla 14, de la mazorca de cacao, presenta un perfil de compuestos alcalinos similar a muestras de cacao (Cafeína, Teobromina y Teofilina) en cuanto al contenido de Cafeína (1.000 a $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Teobromina (2.000 a $20.000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y Teofilina (0.500 a $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) siendo superior a estos con valores de $2,60 \pm 0.04$ y $0.00 \pm 0.00 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para Teobromina, $8,22 \pm 1.41$ y $4,01 \pm 0.79 \mu\text{g/g}$ $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para Cafeína. Sin embargo, estos residuos presentan otro tipo de compuestos alcalinos como: Teobromina, Cafeína y Teofilina [66].

Según una investigación realizada por Gomes y colaboradores [67]. la variación del contenido de metilxantinas en muestras de cacao y sus subproductos dependen de la variedad de parámetros experimentales de fermentación, tales como: la pérdida de humedad de la almendra, la ruptura de las células del cotiledón luego de la muerte del embrión y la eliminación de la lixiviación de las células compuestos entre los días 2 y 3 días de la fermentación.

Por lo tanto, se confirmaría que existe un efecto de la variedad y la zona de procedencia de los residuos de cacao sobre la concentración de fitonutrientes presentes en estas matrices, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las muestras de placenta del Complejo NacionalxTrinitario, presentado por contenidos de Teobromina ($p=0,0000004$), Cafeína ($p=0,0000141$), y el Clon CCN-51, obtuvo un contenido de Teobromina ($p=0,0000000$), Cafeína ($p=0,0000079$) con un nivel de confianza del 95%.

El análisis de correlación de Pearson (r), en muestras residuales de placenta de cacao, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas de placenta de cacao.

PERFILES FENÓLICO Y METILXANTINAS	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	
	ABTS (%)	FRAP (%)
Acido Cafeico	7.90	-79.17
Ácido Cumarico	-7.90	79.17
Ácido Vanílico	-7.90	79.17
Ácido Transferílico	-7.90	79.17
Acido-4 hidroxibenzoico	-7.90	79.17

Como indica la Tabla 15, la actividad antioxidante de placenta de cacao presenta una correlación positiva débil entre el contenido de Ácido Cafeico ($r = 7.90$) y la capacidad antioxidante medida por los métodos de ABTS. Sin embargo, los contenidos Ácido Cumarico, Ácido Vanílico, Ácido Transferílico, Acido-4 hidroxibenzoico, presentaron una correlación negativa débil ($r = -7.90$). En el método de FRAP la actividad antioxidante presentó una correlación negativa alta ($r = -79.17\%$) con el contenido de Ácido Cafeico y correlaciones positivas altas ($r = 79.17\%$) con los contenidos de Ácido Cumarico, Ácido Vanílico, Ácido Transferílico, Acido-4 hidroxibenzoico [69].

De acuerdo con los resultados de la Tabla 15 la actividad antioxidante de la placenta de cacao viene dada por el contenido de Ácido Cumarico, Ácido Vanílico, Ácido Transferílico, Acido-4 hidroxibenzoico, demostrando que, los compuestos bioactivos de este residuo tienen la capacidad de mantener el estado redox en células o tejidos. Este poder reductor podría relacionarse con el grado de hidroxilación y conjugación de dichos polifenoles [70].

A pesar de que la Teobromina y Cafeína son alcaloides naturales, se ha demostrado que estos compuestos protegen del estrés oxidativo. Por lo que, se puede determinar el nivel de correlación encontrado en la Cafeína y Teobromina con los dos métodos de actividad antioxidante in vitro, utilizados en este estudio: ABTS ($>99,00\%$) y FRAP ($>99,00\%$), la implementación de las metilxantinas presenta beneficios cardiovasculares como la reducción de la presión arterial, efectos antiinflamatorios y niveles de colesterol HDL en sangre [8].

De igual forma, que las muestras de placenta de cacao se realizó un análisis de correlación de Pearson (r) entre el contenido de fenólico y metilxantinas para las muestras de mazorca de cacao de las variedades NacionalxTrinitario y clon de CCN 51, como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas de mazorca de cacao.

PERFILES FENÓLICO Y METILXANTINAS	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	
	ABTS (%)	FRAP (%)
Acido Cafeico	-79.17	7.90
Ácido Cumarico	79.17	-7.90
Ácido Transferílico	-79.17	7.90
Acido-4 hidroxí benzoico	-79.17	7.90
Catequina	-79.17	7.90
Epicatequina	-79.17	7.90
Cafeína	-58.92	7.90
Teobromina	69.44	7.90

Como muestra la Tabla 16, la actividad antioxidante de mazorca de cacao presentó una correlación positiva alta en el contenido de Teobromina ($r= 69.64$) y la capacidad antioxidante medida por los métodos de ABTS. Sin embargo, los contenidos Acido Cafeico, Ácido Cumarico, Ácido Transferílico, Acido-4 hidroxí benzoico, Catequina, Epicatequina, presentaron una correlación negativa débil ($r= -79,17$) y Cafeína ($r= -58,92$) también presento una correlación negativa débil. Por lo que, el método de FRAP la actividad antioxidante presento una correlación negativa alta ($r= -7,90\%$) con el contenido de Ácido Cumarico y correlaciones positivas altas ($r= 7,90\%$) con los contenidos de Acido Cafeico, Ácido Transferílico, Acido-4 hidroxí benzoico, Catequina, Epicatequina, Cafeína, Teobromina [69].

Con base en estos resultados, se puede concluir que la capacidad antioxidante medida en las muestras no estuvo directamente determinada por los compuestos fenólicos y metilxantina presentes en mazorca y placenta de cacao. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de este residuo de la industria manufacturera de chocolate puede depender o relacionarse con otros compuestos presentes en concentraciones más altas de 3-flavanoles y metilxantinas.

De acuerdo a los resultados reportados en la Tabla 16. Solo el ácido cumárico es el responsable de la actividad antioxidante en la mazorca de cacao, por tanto, la capacidad antioxidante de las muestras residuales provenientes del sector cacaotero empleando métodos como: ABTS y FRAP donde presentan una correlación positiva débil ($r=0,08 - 0,29$ o 8-29%) con el contenido de Teobromina de la mazorca de cacao cuyos valores corresponden al 69,44; 7,90% respectivamente según los métodos utilizados en esta investigación.

De acuerdo a los resultados basados en este estudio, se puede indicar que los antioxidantes se almacenan en la parte externas de las plantas, tales como mazorca, placenta, cáscara y flores; de la misma forma como en la fruta. Sin embargo, durante el proceso de industrialización o cadena de beneficio del cacao se generan fuentes de componentes bioactivos subutilizados, como los residuos agroindustriales. Sin embargo, estos residuos producidos por el sector agrícola, la mazorca y placenta de cacao, formarían parte de una fuente rica en nutrientes de bajo costo con una excelente actividad biológica. Cuyo potencial permite que los fabricantes o productores cacaoteros asuman riesgos en el proceso de valorización de residuos con un enfoque de economía circular hacia una política ambiental de cero residuos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se logro identificar los compuestos fenólicos como Catequina, Epicatequina, Procianidinas B₁, B₂ y C₁. Y en el contenido de metilxantinas se encontró Cafeína y Teobromina, utilizando el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en muestras residuales de mazorca y placenta de cacao de las variedades NacionalxTrinitario y Clon de CCN-51.
- Se evaluó el efecto de la variedad en las muestras residuales de placenta de cacao de la variedad NacionalxTrinitario y Clon CCN-51, donde presentó un perfil de compuestos fenólicos empleando estándares de Catequina, Epicatequina, Procianidina B₁, B₂ y C₁. Por lo que en dicho perfil se encontraron polifenoles de origen no identificado: Acido-4 hidroxibenzoico (45,9678;10,028 mg•100g⁻¹), Ácido Vainillico (4,087;0 mg•100g⁻¹), Ácido Cumarico (0,875;0,361 mg•100g⁻¹), Acido Cafeico (0,606;1,985 mg•100g⁻¹) y Ácido Transferúlico (2,076;0,219 mg•100g⁻¹). Por otra parte, en la mazorca de cacao presenta únicamente Catequina (5,061;8,812 mg•100g⁻¹) y Epicatequina (0;14,056 mg•100g⁻¹). De igual manera se encontró mayor cantidad de polifenoles de origen no identificado cuyas concentraciones son similares a las muestras de cacao, como Acido-4 hidroxibenzoico (3,796;3,967 mg•100g⁻¹), Ácido Cumarico (1,985;2,048 mg•100g⁻¹), Acido Cafeico (38,975;22,201 mg•100g⁻¹), Ácido Transferúlico (0,878;1,927 mg•100g⁻¹). Por tanto, la carencia de Procianidinas en muestras de mazorca y placenta de cacao, se debe a que estos fitonutrientes se degradan en un 60% durante la fermentación, secado y tostado de la almendra.
- Para el perfil de metilxantinas se utilizó subproductos de cacao (mazorca y placenta), donde encontró compuestos alcalinos similares a los granos de cacao; tales como Cafeína y Teobromina. Por lo que, en la placenta de cacao de la variedad Nacional presentó valores como Cafeína (5,10 %) y Teobromina (5,66 %), siendo superior a los valores de la variedad CCN-51 el contenido de Cafeína (3,03%) y para Teobromina (3,10 %). En cuanto a la mazorca de cacao de la variedad Nacional el contenido de Cafeína (8,22 %) y para Teobromina (2,60 %) siendo superior que la variedad CCN-51 cuyos valores son para Cafeína (4,01 %) y Teobromina (0,00%). Por tanto, la mazorca de cacao demostró tener mayor contenido alcalino.

- Se relacionó el contenido fenólico y alcalino, mediante el coeficiente de correlación (R^2) representado por las ecuaciones de las curvas de calibración del perfil fenólico son las siguientes Catequina (0,9998), Epicatequina (0,9998), Procianidina B₁ (0,9997), Procianidina B₂ (0,9557), Procianidina C₁ (0,9957). Por tanto, en función a los estándares de polifenoles, la concentración se mide en (mg·g⁻¹).
- En base a los resultados obtenidos por el análisis de correlación de Pearson (r) se demostró que la actividad antioxidante presentada por la placenta de cacao, según el método de ABTS la actividad antioxidante es de (r= 7,90) demostrando ser una correlación positiva para el contenido de Ácido Cafeico, mientras que para Ácido Cumarico, Ácido Vanílico, Ácido Transferúlico, Acido-4 hidroxibenzoico, presentó una correlación negativa débil (r= -7.90). Por otra parte, en el método de FRAP la actividad antioxidante representada por el contenido de Ácido Cafeico fue de (r= -79.17%) siendo correlación negativa alta y para el contenido de Ácido Cumarico, Ácido Vanílico, Ácido Transferúlico, Acido-4 hidroxibenzoico demostraron ser una correlación positiva alta (r= 79.17%).
- Mientras que, en la mazorca de cacao la correlación de Pearson (r), según la capacidad antioxidante dada el método de ABTS, el contenido de Ácido Cumarico (r= 79,17%) y Teobromina (r= 69,44%) ambas mostraron ser una correlación positiva alta, a diferencia del Ácido Cumarico, Ácido Transferúlico, Acido-4 hidroxibenzoico, Catequina, Epicatequina, presentaron una correlación negativa débil (r= -79,17%) y Cafeína (r= -58,92%). Por el método de FRAP la actividad antioxidante presentada por el Acido Cafeico represento una correlación de (r= -7,90%) lo cual significa que es una correlación negativa débil, mientras que el Ácido Cumarico, Ácido Transferúlico, Acido-4 hidroxibenzoico, Catequina, Epicatequina, Cafeína y Teobromina, todos ellos presentaron una correlación positiva alta (r= 7,90%).

5.2. Recomendaciones.

- Realizar estudios que involucren el aprovechamiento de residuos del sector cacaotero empleando subproductos como mazorca, placenta, mucilago y cascarilla de las variedades de cacao Nacional y CCN-51 producidos durante la postcosecha del cacao.
- Aprovechar los subproductos de origen agroindustrial cacaotero, que puedan ser analizadas y valorados generando un bienestar económico y agroecológico al país, permitiendo implementar políticas de residuos cero durante la cadena de beneficio del cacao.
- Emplear los compuestos bioactivos de subproductos como mazorca y placenta de cacao, para el desarrollo de productos funcionales dentro de la industria alimentaria, considerando como productos alimenticios de alto valor calórico y funcional.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía.

- [1] A. Abad, C. Acuña y E. Naranjo, «Cocoa on the Ecuadorian coast: a study of its cultural and economic dimension,» *Estudios de la Gestion*, 2020.
- [2] D. Mellor, «Cocoa: Composition and Health Effects,» *Encyclopedia of Food and Health*, p. 1, 2016.
- [3] E. L. M. Orejuela, A. C. Landázuri y B. Goodell, «Second generation biorefining in Ecuador: Circular bioeconomy, zero waste technology, environment and sustainable development: The nexus,» *Journal of Bioresources and Bioproducts*, vol. 6, p. 1, 2021.
- [4] V. R. N. F. K. Campos y B. Oomah, «Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 81, pp. 2-7, 2018.
- [5] H. G. C. Muñoz, «Evaluación de la capacidad antioxidante en cacao Nacional fino de aroma (*Theobroma cacao* L.), de las principales zonas productoras del Ecuador,» p. 18, 2018.
- [6] E. S. Ordoñez, A. A. Leon, R. H. Rivera y E. Vargas, «Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis Vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*).,» *Scientia Agropecuaria*, vol. vol.10, nº no.2, p. 2, Abril 2019.
- [7] N. A. Febrianto y F. Zhu, «Composition of methylxanthines, polyphenols, key odorant volatiles and minerals in 22 cocoa beans obtained from different geographic origins,» *LWT-Food Science and Technology*, p. 2, 2022.
- [8] C. A. A. Arreaga, «“Identificación del perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) de las variedades CCN-51 y Nacional”,» Quevedo, 2020.

- [9] M. S. Guanga, «“Estudio y aprovechamiento de los residuos del cacao de la compañía Nestlé como estrategia comercial”,» p. 18, 2018.
- [10] L. D. Almachi, «“Incorporación de compuestos bioactivos de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) y pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) para el desarrollo de un chocolate blanco con propiedades funcionales”,» p. 21, 2020.
- [11] G. C. A. Balladares, Caracterización físico-química de los desechos agrícolas del cacao y café del litoral Ecuatoriano y su potencial empleo como biocombustibles., España, 2016.
- [12] L. Grob, E. Ott, S. Schnell y J. E. Windhad, «Characterization of endocarp powder derived from cocoa pod,» *Journal of Food Engineering* , pp. 1-3, 2021.
- [13] Z. Ozlem, M. Atanassova, T. Boyunegmez, G. Caruso, G. Antika, S. Sharma, R. J. Sharifi y R. Pezzani, «Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review,» *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 103, pp. 2-3, 2021.
- [14] E. F. Ramos, G. S. Casimiro, P. Á. Fernandez, C. K. Cancino, M. J. Gómez, C. L. De la Fuente y A. M. Muñoz, «Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.),» *LWT - Food Science and Technology*, p. 2, 2021.
- [15] K. Mahan, J. L. Raymond y K. Morrow, «Dietoterapia,» p. 86, 2021.
- [16] B. X. Chávez, A. C. Carbo, E. García y M. J. Cobos, «Estudio socio-económico del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la parroquia febres cordero, cantón Babahoyo Los Ríos-Ecuador.,» *Eumed.net*, 2019.
- [17] G. C. Peralta, «Architecture of Cocoa Farmhouses in Vines and Surroundings. (1880 – 1920.,» *LATINDEX*, p. 3, 2016.
- [18] I. F. Morales, Z. M. Carrillo, N. J. Ferreira, G. M. Peña, C. W. Briones y M. M. Albán, «Cadena de comercialización del cacao nacional en la provincia de Los Ríos, Ecuador,» *Ciencia y Tecnología*, pp. 58-64, 2018.

- [19] J. P. Vargas, V. Ciobotă, W. Salinas, B. Kampe, P. Aponte, P. Rösch, J. Popp y L. Ramos, «Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy,» *Food Chemistry*, 2016.
- [20] S. E. Y. Antolinez, M. J. Almanza, R. A. F. Baraona, D. E. Polanco y C. P. A. Serrano, «Current State of Cocoa Plantation: A Review of its Main Limitations.,» *Ciencia y Agricultura*, pp. 2-3, 2020.
- [21] V. Sánchez, J. L. Zambrano, C. Iglesias, E. Rodriguez, V. Villalobos, F. J. Díaz, N. Carrillo, A. Camacho y O. Rodríguez, «La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe,» 2019.
- [22] S. K. Malhotra y E. Apshara, «Genetic resources of cocoa (*Theobroma cacao* L.) and their utilizationAn Appraisal,» in *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, pp. 3-4, 2017.
- [23] E. W. J. Miguel, C. X. G. Romero y P. J. A. Moreno, «“Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas”,» *CATIE*, pp. 1-10, 2021.
- [24] A. R. Carrillo, M. T. Carvajal, G. A. Mendoza, L. G. Solórzano y F. J. Ponce, «Instructivo de buenas Practicas Cosecha y Pos-cosecha en cacao.,» 2014. [En línea].
- [25] B. M. Á. Pérez, Guía de buenas prácticas de cosecha, fermentación y secado para la producción de cacaos especiales., Colombia., 2017.
- [26] U. B. P. Reyes, «“Contenido de vitamina C, polifenoles y flavonoides totales presentes en mucilago de cacao (*Theobroma cacao* l.) variedad CCN-51 y nacional”.,» 2020. [En línea]. Available: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5939/1/T-UTEQ-0082.pdf>.
- [27] F. Lu, G. J. Rodriguez, D. I. Van, N. J. Westwood, L. Shaw, J. S. Robinson, G. Warren, A. Chatzifragkou, M. S. McQueen, L. Gomez, L. Faas, K. Balcombe, C. Srinivasan, F. Picchioni, P. Hadley y D. Charalampopoulos, «Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions.,» *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 14, pp. 5-8, 2018.

- [28] G. K. S. Tapia, «Evaluación del mucílago y la placenta de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) aplicando dos métodos conservantes en la obtención de mermelada.,» 2016. [En línea]. Available: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2266/1/T-UTEQ-0037.pdf>.
- [29] K. A. Goude, K. M. D. Adingra, O. J. Gbotognon y E. J. P. Kouadio, «Biochemical characterization, nutritional and antioxidant potentials of cocoa placenta (*Theobroma cacao* L.),» *Annals. Food Science and Technology*, vol. 20, n° 3, pp. 2-7, 2019.
- [30] A. Vojvodić, D. Komes, I. Vovk, C. A. Belščak y A. Bušić, «Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates,» *Food Research International*, pp. 4-6, 2016.
- [31] C. P. Guirlanda, G. G. Silva y J. A. Takahashi, «Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product?,» *Future Foods*, p. 7, 2021.
- [32] B. W. J. Martinez, S. E. Bittencourt, M. A. B. Pedroni, J. C. Carvalho, S. G. Karp y e. al., «Agro-industrial wastewater in a circular economy: Characteristics, impacts and applications for bioenergy and biochemicals.,» *Bioresource Technology* , pp. 1-3, 2021.
- [33] M. Alexandri, G. J. P. López, W. A. Olszewska y J. Venus, «Valorising Agro-industrial Wastes within the Circular Bioeconomy Concept: the Case of Defatted Rice Bran with Emphasis on Bioconversion Strategies,» *Fermentation*, pp. 1-6, 2020.
- [34] M. S. A. Brambila y T. Sakao, «Effective ecodesign implementation with the support of a lifecycle engineer.,» *Journal of Cleaner Production*, p. 2, 2021.
- [35] G. O. Akizu, B. Ulibarri, M. Iturrondobeitia, R. Minguez y E. Lizundia, «Ecodesign coupled with Life Cycle Assessment to reduce the environmental impacts of an industrial enzymatic cleaner.,» *Sustainable Production and Consumption*, pp. 1-4, 2022.
- [36] D. K. Van, «The role of ecodesign in the circular economy,» *Circular Economy and Sustainability*, pp. 1-2, 2022.

- [37] G. Barbera, A. L. Capriotti, C. Cavaliere, C. M. Montone, S. Piovesana, R. Samperi, C. R. Zenezini y A. Lagan, «Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of phytochemicals in vegetal-derived food and beverages.,» *Food Research International*, vol. 100, nº 1, pp. 1-3, 2017.
- [38] V. M. Guzmán, «Identificación y cuantificación de sustancias por HPLC.,» 2022. [En línea]. Available: <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/identificacion-y-cuantificacion-de-sustancias-por-hplc/>.
- [39] A. Hamzalıoğlu y V. Gökmen, «Chapter 18 - Interaction between Bioactive Carbonyl Compounds and Asparagine and Impact on Acrylamide,» *Acrylamide in Food*, pp. 2-4, 2016.
- [40] C. M. R. Segura, *Bioactive compounds Health benefits and potential applications*, 2019.
- [41] A. Gvozdjakova, R. Singh, R. B. Singh, T. Takahashi, J. Fedack, K. Hristova, A. Wilczynska, M. Mojto y V. Mojto, «Cocoa consumption and prevention of cardiometabolic diseases and other chronic diseases.,» *Chapter 19*, 2019.
- [42] D. C. Okiyama, S. L. B. Navarro y C. E. C. Rodrigues, «Cocoa shell and its compounds: applications in the food industry.,» *Trends in Food Science & Technology*, pp. 103- 112, 2017.
- [43] N. Mudenuiti, C. A. Costa, S. M. Alencar, R. Danielski, F. Shahidi, T. B. Madeira, E. Y. Hirooka, W. A. Spinosa y G. M. V. Eiras, «Phenolics and alkaloids of raw cocoa nibs and husk: The role of soluble and insoluble-bound antioxidants,» *Food Bioscience*, 2021.
- [44] I. O. Minatel, C. V. Borges, M. I. Ferreira, H. A. Gomez, O. C. Chung-Yen y L. G. P. Pereira, «Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability,» *Open access peer-reviewed chapter*, 2016.

- [45] J. Rojas y A. Buitrago, «Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases,» *Chapter 1*, 2019.
- [46] B. N. Nara, d. A. D. Pereira, R. C. Laceda, D. D. Riberio y S. R. Freitas, «Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR,» *Food Research International*, p. 1, 2016.
- [47] A. I. O. Jideani, H. Silungwe, T. Takalani y A. O. Omolola, «Antioxidant-rich natural fruit and vegetable products and human health.,» *International Journal of Food Properties*, pp. 1-9, 2021.
- [48] K. Lenssen y A. Boer, «The regulatory aspects of substantiating health benefits of foods containing antioxidants,» *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress*, 2022.
- [49] I. Gok, «Bioactive compounds modulating inflammation and oxidative stress in some traditional functional foods and beverages.,» *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress.*, pp. 1-2, 2022.
- [50] B. M. Yapo, V. Besson, B. B. Koubala y K. L. Koffi, «Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source,» *American Journal of Food and Nutrition*, p. 2, 2013.
- [51] R. J. L. Yépez, «Caracterización del contenido de Polifenoles: Catequina, Epicatequina y Procianidina B1, B2 y C1; en cacao CCN-51 de las principales zonas productoras del Ecuador.,» Quito, 2017.
- [52] M. A. Castillo, M. J. A. Medina, M. J. M. Gutierrez y S. L. Fernandez, «Proposal for a Maintenance Management System in industrial environments based on ISO 9001 and ISO 14001 standards,» *Computer Standards & Interfaces*, pp. 8-11, 2020.
- [53] A. G. P. Guevara, A. A. E. Verdesoto y M. N. E. Castro, «Metodologías de investigación educativa (descriptivas, experimentales, participativas, y de

- investigación-acción),» *Revista Científica Mundo de la Investigación y Conocimiento*, pp. 1-4, 2020.
- [54] G. J. B. Domínguez, *Manual de metodología de la investigación científica*, Chimbote, Perú: Tercera Edición., 2015.
- [55] R. B. J. Zhunio, «“Evaluación de la actividad antioxidante en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao*, L.) variedades: ccn-51 y nacional”,» 2020. [En línea]. Available: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5931/1/T-UTEQ-0079.pdf>.
- [56] M. S. Espín y M. I. Samaniego, *Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao.*, Quito, 2016.
- [57] I. Samaniego, S. Espín, J. Quiroz, B. Ortiz, W. Carrillo, C. García-Viguera y P. Mena, «Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador.,» *Journal of Food Composition and Analysis.*, vol. 88, p. 103448, 2020.
- [58] M. Francesco, V. Gunjevic, L. Boffa y G. Cravotto, «Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products.,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies.*, 2021.
- [59] L. Y. Ouattara, E. K. A. Kouassi, D. Soro, Y. Soro, K. B. Yao, K. Adouby, A. P. Drogui, D. R. Tyagi y P. M. Aina, «Cocoa pod husks as potential sources of renewable high-value-added products: A review of current valorizations and future prospects.,» *BioResources*, vol. 16, pp. 1988-2020, 2020.
- [60] A. C. Mellinas, A. Jiménez y M. C. Garrigós, «Optimization of microwave-assisted extraction of cocoa bean shell waste and evaluation of its antioxidant, physicochemical and functional properties.,» *LWT*, vol. 127, 2020.
- [61] H. C. Hernández, A. I. Viera, S. A. M. Morales, B. J. Fernández y G. G. Rodríguez, «Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk.,» *Food Chemistry.*, vol. 240, pp. 831-839, 2018..

- [62] P. P. Abbasi, P. De Nisi, B. Scaglia, A. Scarafoni, S. Pilu y F. Adani, «Recovery of phenolic compounds from agro-industrial by-products: Evaluating antiradical activities and immunomodulatory properties.,» *Food and Bioproducts Processing.*, vol. 127, pp. 338-348, 2021.
- [63] C. L. Valadez, J. C. P. Plazola, O. M. Hernández, N. M. D. Hernández, F. Villarreal, M. H. Necoechea, M. A. Ortiz y G. Ceballos-Reyes, «Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.),» *Innovative Food Science and Emerging Technologies.*, vol. 41, pp. 378-386, 2017.
- [64] Z. Xia, Y. Ni y S. Kokot, «Simultaneous determination of caffeine, theophylline and theobromine in food samples by a kinetic spectrophotometric method.,» *Food Chemistry*, vol. 141, pp. 4087-4093, 2013.
- [65] L. C. Freitas, J. R. Barbosa, A. L. C. da Costa, F. W. F. Bezerra, R. H. H. Pinto y J. R. N. d. Carvalho, «From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products?,» *Resources, Conservation and Recycling.*, vol. 169, p. 105466, 2021.
- [66] M. d. R. Brunetto, L. Gutiérrez, Y. Delgado, M. Gallignani, A. Zambrano, Á. Gómez, G. Ramos y C. Romero, «Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system.,» *Food Chemistry.*, vol. 100, pp. 459-467, 2007.
- [67] P. C. G. Júnior, V. B. dos Santos, A. S. Lopes, J. P. I. de Souza, J. R. S. Pina, J. G. C. A. Chagas y P. S. B. Marinho, «Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation.,» *Food Control*, vol. 108, p. 106887, 2020.
- [68] D. C. Okiyama, I. D. Soares, M. S. Cuevas, E. J. Crevelin, L. A. Moraes, M. P. Melo, A. L. Oliveira y C. E. Rodrigues, «Pressurized liquid extraction of flavanols and

- alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent.,» *Food Research International*, vol. 114, pp. 20-29, 2018.
- [69] J. J. Pérez, J. Serrano, M. Tabernero, S. Arranz, R. M. E. Díaz, D. L. García, I. Goñi y F. Saura-Calixto, «Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors,» *Nutrition*, vol. 24, nº 7-8, pp. 646-653, 2018.
- [70] R. L. Prior, X. Wu y K. Schaich, «Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, pp. 4290-4302, 2005.
- [71] B. A. Valenzuela y B. R. Valenzuela, «Innovation in the food industry: The history of some innovations and of their innovators,» *Scielo*, vol. vol.42, nº no.4, pp. 1-3, Diciembre 2015.
- [72] H. C. Trujillo, «Estudio de la actividad antioxidante en hierbas y frutos,» *e-espacio*, p. 6, Febrero 2019.
- [73] J. Nie, D. Chen, J. Ye, Y. Lu y Z. Dai, «Preparative separation of three terpenoids from edible brown algae *Sargassum fusiforme* by high-speed countercurrent chromatography combined with preparative high-performance liquid chromatography.,» *Algal Research* , pp. 1-3, 2021.
- [74] Agricultores, «El cacao: condiciones de cultivo, composición y valor nutricional.,» 15 Julio 2020. [En línea]. Available: <https://agriculturers.com/el-cacao-condiciones-de-cultivo-composicion-y-valor-nutricional/>.
- [75] G. C. Ramos, «Diseños de investigación experimental.,» *CienciAmérica*, pp. 2-3, 2021.
- [76] R. Jaramillo, K. Medina, A. Recalde, K. Pastás, D. Bedoya y V. Ramírez, «Evaluación del contenido de cadmio en suelos destinados al cultivo de cacao en la provincia de Guayas {Ecuador}.,» *Ecuador es Calidad*, 2015.

- [77] R. J. H. Vera, M. W. J. Jiménez, M. M. C. Naula, C. U. J. Villa, Q. F. A. Zaruma, M. G. Y. Montecé, C. W. J. Cabrera y V. Zambrano, «Residues from cocoa production (*Theobroma cacao* L.) as a food alternative for ruminants,» *Recia*, p. 3, 2021.
- [78] Icco, «Procesamiento de cosecha y poscosecha,» 2022. [En línea]. Available: <https://www.icco.org/harvesting-post-harvest-new/>.
- [79] J. Guevara, «Explicación Paso a Paso: La Cosecha y El Procesamiento del Cacao,» 2018. [En línea]. Available: <https://perfectdailygrind.com/es/2018/03/06/explicacion-paso-paso-la-cosecha-y-el-procesamiento-del-cacao/>.
- [80] Á. Z. J. Coronel, «“Determinación de la actividad antioxidante de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de las variedades Ccn-51 y Nacional por distintos métodos”,» Mocache, 2021.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 1. Proceso de postcosecha y recolección de la muestra de variedades de cacao CCN-51 y Nacional.

Recolección de las muestras.



Rotulado de la muestra



Pesado de la muestra fresca (mazorca)



Fraccionamiento de la muestra fresca (mazorca)



Pesado de la muestra fraccionada (mazorca)



Muestra lista para almacenar (mazorca).



Muestra lista para almacenar (placenta).



Almacenamiento de las muestras en frío (mazorca y placenta).



Secado de la muestra



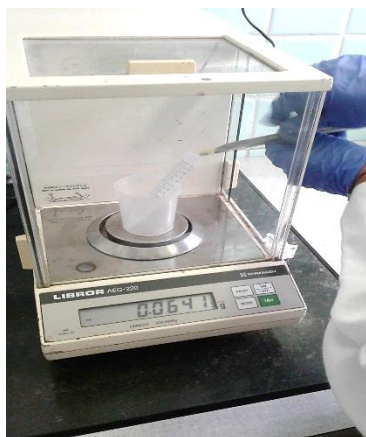
Muestra liofilizada



Anexo 2. Extracción de los polifenoles y flavonoides.

Preparación de concentrado.

Pesado de la muestra liofilizada



Añadir solución extractora.



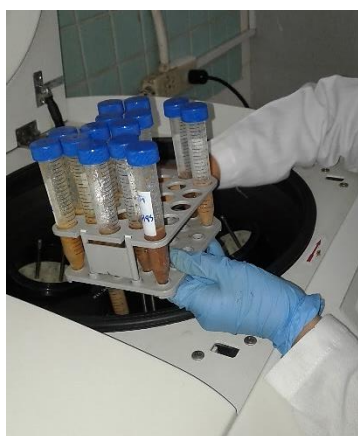
Muestras en el agitador Vortex.



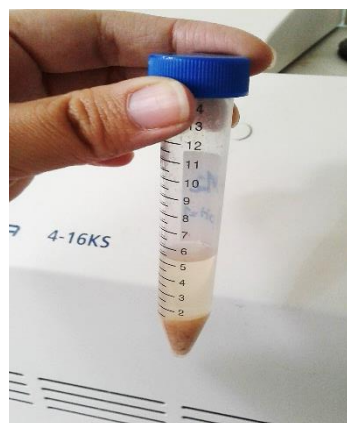
Muestras en el baño ultrasónico.



Muestras en la centrífuga.



Muestras listas para trasvasar.



Trasvasado de la muestra.



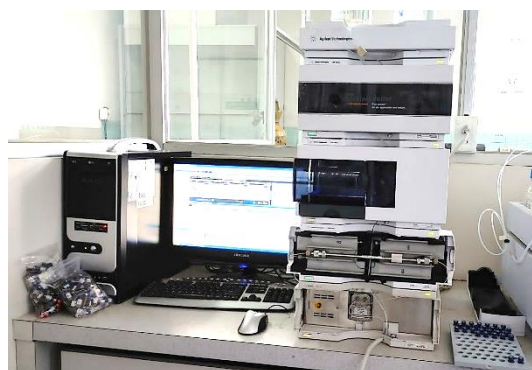
Concentrado de la muestra.



Concentrado listo en los viales.



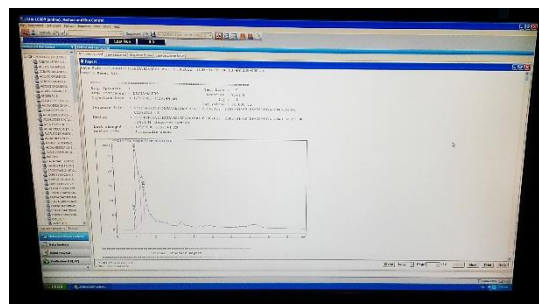
Equipo cromatógrafo (HPLC).



Inyección de la muestra en el cromatógrafo.



Lecturas del HPLC.



Anexo 3. Extracción de las metilxantinas.

Preparación de concentrado.

Pesado de la muestra liofilizada.



Añadir agua bidestilada a la muestra



Muestra aforadas con agua bidestilada



Plancha de agitacion con calentamiento



Muestras listas para filtrar



Solucion Extractora Carrez 1 y 2



Añadir solución extractora Carrez



Filtrado de la muestra



Añadir agua bidestilada al ras



Filtrado en membrana Milipore



Estandar de Teobromina-Cafeína



Concentrado de la muestra



Concentrado listo en frasco ámbar



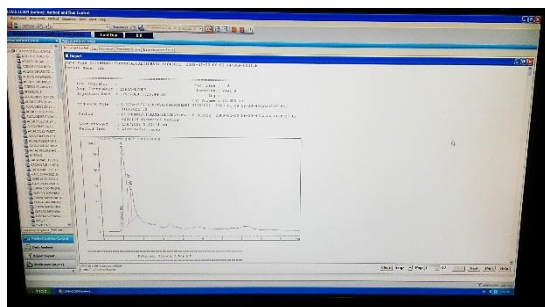
Equipo cromatógrafo (HPLC)



Inyección de la muestra en el cromatógrafo



Lecturas del HPLC



Anexo 4. Datos obtenidos para calcular el índice de rendimiento de la mazorca y placenta de cacao Nacional y CCN-51.

RENDIMIENTO RESIDUAL DE CACAO CCN-51 Y NACIONAL (gr)				
Nacional	Peso de mazorca	Cáscara	Placenta	Almendra en baba
1	576,00	373,00	10,00	101,00
2	511,00	292,00	7,00	136,00
3	569,00	335,00	6,00	141,00
4	590,00	364,00	11,00	150,00
5	672,00	433,00	13,00	164,00
6	935,00	632,00	17,00	101,00
7	551,00	376,00	7,00	96,00
8	707,00	424,00	11,00	184,00
9	531,00	358,00	8,00	86,00
10	1 012,00	783,00	21,00	157,00
CCN-51	Peso de mazorca	Cáscara	Placenta	Almendra en baba
1	834,00	425,00	21,00	301,00
2	278,00	154,00	7,00	90,00
3	520,00	275,00	15,00	183,00
4	1 272,00	603,00	37,00	406,00
5	513,00	252,00	16,00	182,00
6	1 036,00	570,00	31,00	348,00
7	546,00	291,00	12,00	178,00
8	1 011,00	514,00	29,00	396,00
9	437,00	250,00	12,00	139,00
10	391,00	193,00	8,00	137,00

TABLAS DEL ANDEVA DE PLACENTA DE CACAO DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL.

Anexo 5. Resumen estadístico del Ácido-4 hidroxibenzoico, de la placenta de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	45,9678	10,0279
Varianza	0	2E-08
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	359396,8145	
P(T<=t) una cola	8,85678E-07	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	1,77136E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 6. Resumen estadístico del Ácido Vainillico, de la placenta de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	4,087	0,000005
Varianza	0	5E-11
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	817391,7063	
P(T<=t) una cola	3,89421E-07	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	7,78843E-07	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 7. Resumen estadístico del Ácido Cumárico, de la placenta de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	0,87495	0,361
Varianza	5E-09	0
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	10278,99992	
P(T<=t) una cola	3,0967E-05	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	6,1934E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 8. Resumen estadístico del Ácido Cafeico, de la placenta de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	0,606	1,98495
Varianza	0	5E-09
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-27579,00131	
P(T<=t) una cola	1,15417E-05	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	2,30835E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 9. Resumen estadístico del Ácido Transferúlico, de la placenta de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	2,076	0,2189
Varianza	0	2E-08
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	18570,99923	
P(T<=t) una cola	1,71402E-05	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	3,42803E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

TABLAS DEL ANDEVA DE MAZORCA DE CACAO DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL.

Anexo 10. Resumen estadístico del Ácido-4 hidroxí benzoico, de la mazorca de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	3,796	3,96695
Varianza	0	5E-09
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-3419,000001	
P(T<=t) una cola	9,31003E-05	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,000186201	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 11. Resumen estadístico del Ácido Caféico, de la mazorca de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	1,985	2,04795
Varianza	0	5E-09
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-1259	
P(T<=t) una cola	0,000252827	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	0,000505655	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 12. Resumen estadístico del Ácido Cumárico, de la mazorca de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	38,975	22,20095
Varianza	0	5E-09
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	335486,588	
P(T<=t) una cola	9,48801E-07	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	1,8976E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 13. Resumen estadístico del Ácido Transferulico, de la mazorca de cacao.

	Nacional	CCN-51
Media	0,878	1,92695
Varianza	0	5E-09
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-20979,00006	
P(T<=t) una cola	1,51728E-05	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	3,03456E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 14. Resumen estadístico de Catequina, de la mazorca de cacao.

	<i>Nacional</i>	<i>CCN-51</i>
Media	5,061	8,81195
Varianza	0	5E-09
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-75018,9969	
P(T<=t) una cola	4,24306E-06	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	8,48611E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	

Anexo 15. Resumen estadístico de Epicatequina, de la mazorca de cacao.

	<i>Nacional</i>	<i>CCN-51</i>
Media	0	14,05595
Varianza	0	5E-09
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	#¡DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-281118,8885	
P(T<=t) una cola	1,1323E-06	
Valor crítico de t (una cola)	6,313751515	
P(T<=t) dos colas	2,26459E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	12,70620474	