



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

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

**Título de la Unidad de Integración Curricular**

“IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO DEL MUCÍLAGO Y  
CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE LAS VARIEDADES  
CCN-51 Y NACIONAL”

**Autor**

Adner Alejandro Arreaga Chévez

**Tutor de la Unidad de Integración Curricular**

Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc (UTEQ)

Dr. Iván Rodrigo Samaniego Maigua (INIAP)

**Mocache – Los Ríos – Ecuador**

2019 – 2020



## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, Arreaga Chávez Adner Alejandro, 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.

---

Arreaga Chávez Adner Alejandro  
C.I. 1206554600



## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

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

CERTIFICA que el estudiante Arreaga Chévez Adner Alejandro, realizó de la Unidad de Integración Curricular titulada “IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO DEL MUCÍLAGO Y CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE LAS VARIETADES CCN-51 Y NACIONAL”, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

---

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.  
Auspiciante Académico (UTEQ)

---

Dr. Iván Samaniego Maigua, MSc.  
Auspiciante Académico (INIAP)



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

Dado cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, la suscrita Ing. Wilma Maribel Llerena Silva, MSc. en calidad de Directora de la Unidad de Integración Curricular titulada “IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO DEL MUCÍLAGO Y CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) DE LAS VARIETADES CCN-51 Y NACIONAL” de autoría del estudiante Arreaga Chévez Adner Alejandro, 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.

**URKUND**

### **Document Information**

---

<b>Analyzed document</b>	TESIS_Adner Arreaga_16-Nov-2020-5.docx (D86413791)
<b>Submitted</b>	11/24/2020 3:35:00 AM
<b>Submitted by</b>	
<b>Submitter email</b>	adner.arreaga2015@uteq.edu.ec
<b>Similarity</b>	3%
<b>Analysis address</b>	wllerenas.uteq@analysis.arkund.com

---

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.  
Auspiciante Académico (UTEQ)

---

Dr. Iván Samaniego Maigua, MSc.  
Auspiciante Académico (INIAP)



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

**Título**

**“IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO DEL MUCÍLAGO Y  
CASCARILLA 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  
Ingeniera en Alimentos.

Aprobado por:

Ing. Christian Vallejo Torres, MSc.  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Rossy Rodríguez Castro, MSc.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Ángel Fernández Escobar, MSc.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Mocache- Los Ríos- Ecuador

2020

## AGRADECIMIENTO

Mi siguiente trabajo de tesis va dedicado a Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerza, fortaleza y sabiduría para seguir con mis metas trazadas sin desfallecer.

Agradecido enormemente con mis padres Maritza Chévez y Luis Arreaga por ser ese pilar fundamental que, con su apoyo incondicional, amor y confianza permitieron que logre culminar mi carrera profesional. A mis hermanas Olivia y Mayerli y a mis familiares que siempre estuvieron incentivándome a seguir adelante para culminar mis estudios.

A la Facultad de Ciencias Pecuarias perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por darme la oportunidad de adquirir conocimientos y formarme como profesional en la Carrera de Ingeniería en Alimentos.

Al Departamento de Nutrición y Calidad, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP. A la Asociación “La Cruz” por habernos facilitado materia prima y haber permitido el uso de las instalaciones para el desarrollo postcosecha del trabajo de investigación. Al proyecto del Fondo competitivo FOCICYT 2019-2020 de la UTEQ: VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE LA CADENA DE BENEFICIO DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS CON PROPÓSITOS FUNCIONALES.

A mi tutora MSc. Wilma Llerena Silva quien desde el primer momento me brindo su amistad y guía, enseñándome sus conocimientos y experiencia para que mi trabajo de investigación sea exitoso. Al Dr. Iván Samaniego por habernos brindado su apoyo y por contribuir de manera especial en el desarrollo de mi tema de investigación.

## RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

La producción de cacao en Ecuador, es considerada como uno de los rubros más importantes; presentando una alta diferencia en relación a otros productos de exportación. Este fruto se cultiva, cosecha y comercializa con gran continuidad, generando una gran cantidad de residuos como mazorcas, exudado, placenta y cascarilla. La identificación del perfil fenólico de las muestras de mucílago y cascarilla de cacao se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC); encontrándose Procianidinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, y C<sub>1</sub>, Catequina, Epicatequina y Metilxantinas en muestras de mucílago, mientras que en la cascarilla presento Cafeína y Teobromina. A nivel estadístico se demostró que existe un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) de la variedad sobre el contenido de fitonutrientes en el mucilago y cascarilla de cacao; reportándose valores superiores de 3-flavan-ols en (CAT =35,44; PCN-B<sub>2</sub>=35,10; PCN-B<sub>1</sub>=25,68; PCN-C<sub>1</sub>=16,83 y EPI=13,71 mg•L<sup>-1</sup>) y metilxantinas (CAF =0,90; TBR =2,65%) en la variedad Nacional. En cacao CCN-51 (PCN-B<sub>2</sub>=9,20; EPI=6,69; PCN-C<sub>1</sub>= 6,01; PCN-B<sub>1</sub>=5,56; CAT=2,94 mg•L<sup>-1</sup>; CAF=0,12% y TBR=0,48%). En cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 se observó un efecto de la variedad sobre el contenido de Catequina (16,16) mg•g<sup>-1</sup> y metilxantinas (CAF=0,35; TBR=1,28 %) siendo superior en la variedad Nacional que en la CCN-51 (CAT= 4,99 mg•g<sup>-1</sup>; CAF=0,11 y TBR=0,92%). Sin embargo, en el contenido de Epicatequina no presento diferencias significativas entre las dos muestras: 0,83 y 0,84 mg•g<sup>-1</sup> para las variedades Nacional y CCN-51. A partir del análisis de correlación de Pearson se demostró que la actividad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC, presenta una correlación positiva fuerte (<99%) con el contenido de Procianidinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>), Epicatequina, Catequina y positiva moderada (94%) con el contenido de metilxantinas; mientras que; en cascarilla de cacao se evidenció que la capacidad antioxidante de este residuo, no depende del contenido fenólico de las muestras. A través de análisis de correlación canónica que Teobromina, Epicatequina y Cafeína son los responsables de la capacidad antioxidante (CA) de los residuos de cacao; presentando una correlación con una magnitud particularmente fuerte (0,9999) con el método de FRAP. Demostrando que estos fitonutrientes pueden actuar como prooxidantes reduciendo los compuestos metálicos, lo que favorece la acción de los compuestos antioxidantes en el organismo.

**Palabras claves:** co-productos de cacao, 3-flavan-ols, alcaloides de cacao, actividad antioxidante, ingredientes funcionales.

## ABSTRACT AND KEYWORDS

Cocoa production in Ecuador is considered one of the most important items; presenting a high difference in relation to other export products. This fruit is cultivated, harvested and commercialized with great continuity, generating a large amount of waste such as ears, exudate, placenta and husk. The identification of the phenolic profile of the mucilage and cocoa husk samples was carried out by High Resolution Liquid Chromatography (HPLC); being Procyanidins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and C<sub>1</sub>, Catechin, Epicatechin and Methylxanthines in mucilage samples, while in the husk I present Caffeine and Theobromine. At a statistical level, it was shown that there is a significant effect ( $p < 0,05$ ) of the variety on the content of phytonutrients in the mucilage and cocoa husk; reporting higher values of 3-flavan-ols in (CAT = 35,44; PCN-B<sub>2</sub> = 35,10; PCN-B<sub>1</sub> = 25,68; PCN-C<sub>1</sub> = 16,83 and EPI = 13,71 mg • L<sup>-1</sup>) and methylxanthines (CAF = 0,90; TBR = 2,65%) in the Nacional variety. In cocoa CCN-51 (PCN-B<sub>2</sub> = 9,20; EPI = 6,69; PCN-C<sub>1</sub> = 6,01; PCN-B<sub>1</sub> = 5,56; CAT = 2,94 mg • L<sup>-1</sup>; CAF = 0,12% and TBR = 0,48%). In Nacional cocoa husk and CCN-51 an effect of the variety was observed on the content of Catechin (16,16) mg•g<sup>-1</sup> and methylxanthines (CAF = 0,35; TBR = 1,28%) being higher in the Nacional variety than in the CCN-51 (CAT = 4,99 mg•g<sup>-1</sup>; CAF = 0,11 and TBR = 0,92%). However, in the Epicatechin content there were no significant differences between the two samples: 0,83 and 0,84 mg•g<sup>-1</sup> for the Nacional and CCN-51 varieties. From Pearson's correlation analysis it was shown that the antioxidant activity measured by ABTS, FRAP and ORAC, presents a strong positive correlation (<99%) with the content of Procyanidins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and C<sub>1</sub>), Epicatechin, Catechin and positive moderate (94%) with the content of methylxanthines; while; in cocoa husk it was evidenced that the antioxidant capacity of this residue does not depend on the phenolic content of the samples. Through canonical correlation analysis that Theobromine, Epicatechin and Caffeine are responsible for the antioxidant capacity (CA) of cocoa residues; presenting a correlation with a particularly strong magnitude (0,9999) with the FRAP method. Demonstrating that these phytonutrients can act as pro-oxidants reducing metal compounds, which favors the action of antioxidant compounds in the body.

**Key words:** cocoa co-products, 3-flavan-ols, cocoa alkaloids, antioxidant activity, functional ingredients.

# TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	4
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	4
1.1. Problema de la investigación.....	5
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
CAPITULO II.....	9
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN .....	9
2.1. Marco conceptual. ....	10
2.1.1. Mucílago.....	10
2.1.2. Cascarilla .....	10
2.1.3. Antioxidantes.....	10
2.1.4. Microencapsulación de alimentos. ....	10
2.1.5. Compuestos bioactivos. ....	11
2.1.6. Cromatografía.....	11
2.1.7. Polifenoles. ....	11
2.2. Marco teórico.....	12
2.2.1. Producción de cacao en Ecuador.....	12
2.2.2. Cacao. ....	13
2.2.3. Valorización de los residuos.....	22
2.2.4. Industrialización del cacao .....	25
2.2.5. Compuestos bioactivos. ....	25
2.2.6. Polifenoles .....	25
2.2.7. Perfil de polifenoles.....	26

2.2.8. Flavonoides.....	27
2.2.9. Fenoles simples.....	27
2.2.10. Capacidad antioxidante.....	28
2.2.11. Microencapsulación de compuestos bioactivos.....	29
2.2.12. Alimento funcional.....	29
2.3. Marco referencial.....	29
CAPÍTULO III .....	32
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	32
3.1. Localización.....	33
3.2. Tipo de investigación.....	33
3.2.1. Investigación descriptiva.....	33
3.2.2. Investigación exploratoria.....	33
3.2.3. Investigación experimental.....	34
3.3. Métodos de la investigación.....	34
3.3.1. Método inductivo-deductivo.....	34
3.3.2. Método experimental.....	34
3.4. Fuentes de recopilación de información.....	34
3.5. Diseño de la investigación.....	35
3.5.1. Esquema del ANDEVA.....	36
3.5.2. Análisis de correlación.....	38
3.6. Instrumentos de la investigación.....	38
3.6.1. Muestreo.....	38
3.6.2. Fermentación y secado del cacao.....	39
3.6.3. Preparación de las muestras.....	39
3.6.4. Extracción de compuestos bioactivos.....	40
3.6.5. Cuantificación del perfil fenólico.....	41
3.6.6. Cuantificación de Metilxantinas.....	41
3.7. Tratamientos de datos.....	42
3.7.1. Variables.....	42

3.8. Recursos humanos y materiales.....	43
3.8.1. Recursos humanos.....	43
3.8.2. Materiales.....	43
CAPÍTULO IV .....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
4.1. Resultados.....	46
4.1.1. Validación de los métodos.....	46
4.1.2. Adaptación de las condiciones del método.....	46
4.1.3. Linealidad .....	47
4.1.4. Tiempos de retención.....	49
4.1.5. Identificación y cuantificación del perfil fenólico.....	50
4.1.5.1. Mucilago de cacao .....	50
4.1.2. Cascarilla de cacao .....	53
4.1.2.1. Cuantificación de compuestos fenólicos en cascarilla de cacao.....	55
4.1.3. Identificación del perfil de alcaloides.....	56
4.1.3.1. Mucílago de cacao.....	56
4.1.3.2. Cascarilla de cacao.....	59
CAPITULO V.....	67
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	67
5.1. Conclusiones.....	68
5.2. Recomendaciones .....	70
CAPITULO VI.....	71
BIBLIOGRAFÍA .....	71
CAPITULO VII.....	81
ANEXOS .....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición química del grano de cacao .....	18
<b>Tabla 2.</b> Métodos de fermentación de cacao empleados en Ecuador .....	20
<b>Tabla 3.</b> Métodos de secado de cacao.....	21
<b>Tabla 4.</b> Composición química del mucílago de cacao .....	23
<b>Tabla 5.</b> Composición química de la cascarilla de cacao .....	24
<b>Tabla 6.</b> Localización del trabajo experimental.....	33
<b>Tabla 7.</b> Combinación de tratamientos para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico del mucílago de cacao. ....	36
<b>Tabla 8.</b> Prueba t de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico del mucílago de cacao.....	37
<b>Tabla 9.</b> Matriz de correlación para relacionar el perfil fenólico (polifenoles y flavonoides) del mucílago de cacao con la actividad antioxidante .....	38
<b>Tabla 10.</b> Condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía HPLC.....	46
<b>Tabla 11.</b> Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración de flavan-3-ols para la validación de métodos de cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC.....	47
<b>Tabla 13.</b> Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas del mucílago de cacao.....	62
<b>Tabla 14.</b> Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas de la cascarilla de cacao.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Partes del cacao.....	2
<b>Figura 2.</b> Producción de cacao en Ecuador .....	12
<b>Figura 3.</b> Cacao CCN-51 .....	14
<b>Figura 4.</b> Cacao Nacional .....	15
<b>Figura 5.</b> Cacao Criollo .....	16
<b>Figura 6.</b> Cacao Trinitario .....	16
<b>Figura 7.</b> Cacao Forastero.....	17
<b>Figura 8.</b> Estructuras químicas de compuestos fenoles simples.....	28
<b>Figura 9.</b> Curvas 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).....	48
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de las mezclas de los estándares puros de polifenoles flavan-3-ol.....	49
<b>Figura 11.</b> Identificación del perfil fenólico del mucílago de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B).....	50
<b>Figura 12.</b> Cromatograma típico de una muestra de cacao CCN-51 .....	51
<b>Figura 13.</b> Compuestos fenólicos del mucílago de cacao.....	52
<b>Figura 14.</b> Identificación del perfil fenólico de la cascarilla de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B). .....	54
<b>Figura 15.</b> Compuestos fenólicos de la cascarilla de cacao.....	55
<b>Figura 16.</b> Identificación del perfil de metilxantinas del mucílago de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B). .....	56
<b>Figura 17.</b> Metilxantinas del mucílago del cacao.....	57
<b>Figura 18.</b> Identificación del perfil de metilxantinas de la cascarilla de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B). .....	59
<b>Figura 19.</b> Metilxantinas de la cascarilla de cacao .....	60
<b>Figura 20.</b> Análisis de correlación canónica entre la capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC y el contenido fenólico y metilxantinas de mucílago y cascarilla de cacao.....	65

## CÓDIGO DUBLIN

<b>Título:</b>	<b>“IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO DEL MUCÍLAGO Y CASCARILLA DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) DE LAS VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL”</b>
<b>Autor:</b>	Arreaga Chévez Adner Alejandro
<b>Palabras clave:</b>	co-productos de cacao, 3-flavan-ols, alcaloides de cacao, actividad antioxidante, ingredientes funcionales.
<b>Fecha de publicación:</b>	
<b>Editorial:</b>	QUEVEDO. UTEQ, 2020
<b>Resumen:</b>	<p>La producción de cacao en Ecuador, es considerada como uno de los rubros más importantes; presentando una alta diferencia en relación a otros productos de exportación. Este fruto se cultiva, cosecha y comercializa con gran continuidad, generando una gran cantidad de residuos como mazorcas, exudado, placenta y cascarilla. La identificación del perfil fenólico de las muestras de mucílago y cascarilla de cacao se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC); encontrándose Procianidinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, y C<sub>1</sub>, Catequina, Epicatequina y Metilxantinas en muestras de mucílago, mientras que en la cascarilla presento Cafeína y Teobromina. A nivel estadístico se demostró que existe un efecto significativo (<math>p &lt; 0,05</math>) de la variedad sobre el contenido de fitonutrientes en el mucilago y cascarilla de cacao; reportándose valores superiores de 3-flavan-ols en (CAT=35,44; PC-B<sub>2</sub>=35,10; PC-B<sub>1</sub>=25,68; PC-C<sub>1</sub>=16,83 y EPI=13,71 mg•L<sup>-1</sup>) y metilxantinas (CAF=0,90; TBR=2,65%) en la variedad Nacional. En cacao CCN-51 (PC-B<sub>2</sub>=9,20; EPI=6,69; PC-C<sub>1</sub>=6,01; PC-B<sub>1</sub>=5,56; CAT=2,94 mg•L<sup>-1</sup>; CAF=0,12% y TBR=0,48%). En cascarilla de cacao Nacional y CCN-51 se observó un efecto de la variedad sobre el contenido de Catequina (16,16 mg•g<sup>-1</sup> y metilxantinas (CAF=0,35; TBR=1,28 %) siendo superior en la variedad Nacional que en la CCN-51 (CAT=4,99 mg•g<sup>-1</sup>; CAF=0,11 y TBR=0,92%). Sin embargo, en el contenido de Epicatequina no presento diferencias significativas entre las dos muestras: 0,83 y 0,84 mg•g<sup>-1</sup> para las variedades Nacional y CCN-51. A partir del análisis de correlación de Pearson se demostró que la actividad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC, presenta una correlación positiva fuerte (&lt;99%) con el contenido de Procianidinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>), Epicatequina, Catequina y positiva moderada (94%) con el contenido de metilxantinas; mientras que; en cascarilla de cacao se evidenció que la capacidad antioxidante de este residuo, no depende del contenido fenólico de las muestras. A través de análisis de correlación canónica que Teobromina, Epicatequina y Cafeína son los responsables de la capacidad antioxidante (CA) de los residuos de cacao; presentando una correlación con una magnitud particularmente fuerte (0,9999) con el método de FRAP. Demostrando que estos fitonutrientes pueden actuar como prooxidantes reduciendo los compuestos metálicos, lo que favorece la acción de los compuestos antioxidantes en el organismo.</p>
<b>Descripción:</b>	hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM
<b>URL:</b>	

## INTRODUCCIÓN

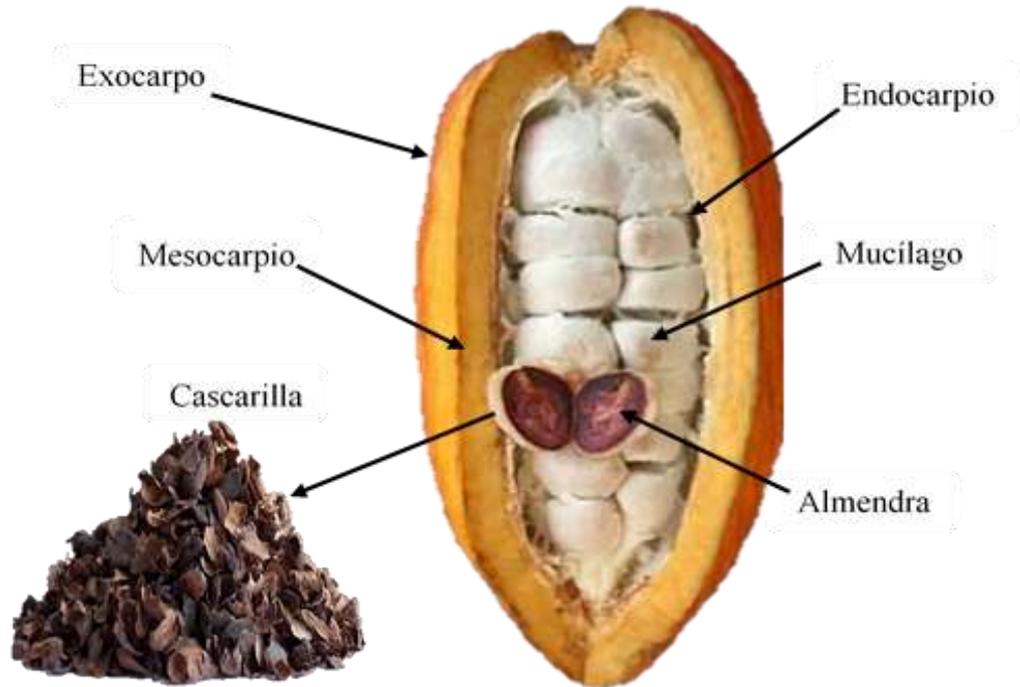
En Ecuador, la producción de cacao es considerada como uno de los rubros más importantes del país; presentando una alta diferencia en relación a otros productos de exportación. Este fruto se cultiva, cosecha y comercializa con gran continuidad, demostrando que es un segmento de mercado rentable en todos sus aspectos [1].

A pesar de que en la actualidad se cultivan diferentes tipos de cacao en el país, el fruto de la Colección Castro Naranjal (CCN-51) es uno de los mayores explotados, por su alta productividad, calidad y tolerancia a enfermedades. Sin embargo, para los países chocolateros el cacao ecuatoriano Nacional fino y de aroma se destaca frente a almendras de otros orígenes, por lo que, son considerados como un producto emblemático gracias a su aroma y sabores frutales y florales [2].

A nivel mundial, la participación comercial de cacao fino de aroma es del 75%, con 315000 toneladas en el año 2018 [3]. Por lo que, la tradicionalmente denominada “pepa de oro” es el sustento de un gran número de familias campesinas [2]. Dichos agricultores tienen conocimiento del manejo adecuado de las almendras frescas, pero muy poco conocimiento del tratamiento de los residuos generados durante el proceso de beneficiado y transformación; desechando en la naturaleza sustratos ricos en nutrientes [4].

La pulpa fresca de cacao está compuesta por agua (80%), glucosa (8,5%), fructosa (7,2%), pectinas (1%), ácido cítrico (1,8%) y ácidos orgánicos no volátiles (0,7%). Además, de cantidades mínimas de almidón (0,3%), ácidos volátiles (0,2%) y sales (0,3%) [5]. En un principio de mucílago o pulpa de cacao es estéril, pero una vez abierta la mazorca la presencia de azúcar y la adecuada acidez (pH 3,5) brindan excelentes condiciones para el desarrollo de microorganismos [5]. Este es necesario para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras, produciendo entre 5 a 7% de exudado; desperdiciándose más de 70 litros material mucilaginoso por tonelada de cacao en baba [6].

En la fase de transformación del cacao en chocolate también se generan residuos y sólo de cascarilla se obtiene el 12% del peso de la almendra. Según expertos en la fabricación de productos a base de cacao, el rendimiento del fruto es de alrededor del 15% de su peso fresco. El 85% restante es considerado como el desecho entre cáscara, mucílago y cascarilla. En el 2017, la actividad cacaotera del país generó un promedio de 34800 ton/año de cascarilla [7].



**Figura 1.** *Partes del cacao*

Las industrias agroalimentarias generan grandes cantidades de desechos sólidos o líquidos biodegradables y consisten en residuos orgánicos de materias primas procesadas. El sector de bebidas genera la mayor cantidad de residuos (26%), seguido por la industria láctea (21%), producción y procesamiento de frutas y verduras (14,8%), cereales (12,9%), procesamiento y conservación de productos cárnicos (8%), fabricación y procesamiento de aceites vegetales y animales (3,9%) procesamiento y conservación de productos pesqueros (0,4%) y otros (12,7%) [8]. La valorización de residuos de alimentos incluye diferentes estrategias de gestión de desechos, cuyo objetivo es convertir los desperdicios en derivados de valor agregado. Estos pueden ser utilizados en el campo de los alimentos u otros sectores industriales [9].

La técnica de microencapsulación ha venido utilizándose en los últimos años, para conservar diferentes principios activos: sólidos, líquidos o gaseosos. Esta evita la degradación de las propiedades biológicas y fisicoquímicas de sustancias presentes en compuestos bioactivos y se encuentran expuestas a condiciones de temperatura y humedad que afecten su calidad [10].

La presente investigación está enfocada en identificar el perfil de polifenoles y flavonoides de mucílago y cascarilla de cacao variedades CCN-51 y Nacional. Esto permitiría evidenciar el efecto benéfico que poseen los residuos (exudado y cascarilla) de la industria cacaotera y chocolatera, que son desperdiciados en la naturaleza por los agricultores. El resultado del estudio busca dar respuesta a la demanda social, ambiental y económica de este importante segmento de la producción, mediante la agrovalorización.

## **CAPITULO I**

# **CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

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

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

El Ecuador es uno de los principales exportadores de cacao para los países europeos y de Norte América, debido a la excelente calidad, aroma y sabor. Las características del cacao fino de aroma le han permitido al productor ecuatoriano mantener una posición privilegiada en el mercado internacional de manera sostenida. A pesar de estas referencias, los productores de cacao no han aprovechado de forma integral todos los recursos generados a lo largo de la cadena de valor [11].

En el proceso de beneficio del cacao, el sector genera dos tipos de residuos considerables: la cáscara y el mucílago. La cáscara es usada como abono para plantas, pero para el mucílago no se han establecido usos claros y específicos. Por lo que. Muchas veces se efectúa el proceso de fermentación dentro del mismo medio en que se lo recolecta, desechando el exudado en el campo [12].

De igual manera, durante los procesos de transformación del cacao en chocolate se retira la cascarilla de las almendras; misma que, son depositadas en el suelo y posteriormente convertidas en abono o desecho. Según diferentes estudios, este residuo industrial puede emplearse en el desarrollo de subproductos como infusiones, lo que evidencia una oportunidad de aprovechamiento de recursos y de generación de ingresos a través de la creación de nuevos productos [13].

#### **1.1.1.1. Diagnóstico.**

El desaprovechamiento de residuos agroindustriales generados en la cadena de valor del cacao está siendo desechados en el mismo medio en que se recolectan y fermentan las mazorcas. Tanto del mucílago como de la cascarilla de cacao pueden aprovecharse componentes bioactivos (antioxidantes) con una función específica en el organismo, pero

los incipientes estudios de estos residuos no han permitido su aprovechamiento integral. Por lo que, son únicamente empleados en la elaboración de productos de menor valor comercial como jaleas y saborizantes.

En la actualidad, el poco aporte económico que estos residuos representan, conducen a la acumulación frecuente de desechos; convirtiéndose en un foco de contaminación por los malos olores, presencia de plagas (insectos, roedores) y microorganismos. Sin embargo, la valorización de estos residuos a través de la extracción de compuestos de alto valor biológico (prevención de enfermedades crónicas degenerativas) podría incrementar los ingresos de los productores de cacao. Los suplementos o alimentos enriquecidos con estos componentes tienen un costo elevado a nivel comercial, ya que, el consumo de antioxidantes es una de las tendencias con mayor potencial de crecimiento en el mercado internacional [14].

#### **1.1.1.2. Pronóstico.**

Al no trabajar en la valorización del mucílago y cascarilla de cacao, estos residuos se seguirán acumulando en los centros de acopio del país para posteriormente descargarlo en el medio ambiente. Con el paso del tiempo, estos desechos degradan el entorno en los que son eliminados debido a que el lixiviado contiene bacterias acéticas y lácticas que se reproducen de forma inmediata, generando malos olores y atrayendo plagas. Por otro lado, 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.

Sin embargo, al no aprovechar estos residuos agroindustriales se están perdiendo oportunidades de empleo y de innovar dentro de la industria alimentaria, brindando otras alternativas de ingreso al país.

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

¿El perfil de los polifenoles y flavonoides del mucílago y cascarilla de cacao variedades CCN-51 y Nacional, presentará propiedades funcionales y una alta actividad antioxidante?

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

¿Cuáles son los polifenoles y flavonoides responsables de la actividad antioxidante del mucílago y cascarilla de cacao?

¿Existirá algún efecto de la variedad de procedencia del mucílago y cascarilla de cacao sobre el perfil de polifenoles y flavonoides?

¿Cuáles son los métodos recomendados para la extracción y conservación de los fitonutrientes del mucílago y cascarilla de cacao?

¿Los componentes bioactivos del mucílago y cascarilla del cacao podrían ser aprovechados como ingredientes funcionales en el desarrollo de nuevos productos?

## **1.2. Objetivos.**

### **1.2.1. Objetivo General.**

- Evaluar el perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional.

### **1.2.2. Objetivos Específicos.**

- Identificar el tipo de fenoles simples, polifenoles y flavonoides presentes en el mucílago y cascarilla del cacao.
- Indicar el efecto de la variedad en el tipo de polifenoles y flavonoides en el mucílago y cascarilla de cacao.
- Relacionar el contenido polifenólico del mucílago y cascarilla de cacao con la actividad antioxidante.

### **1.3. Justificación.**

En la actualidad existe una limitada información acerca de los fitonutrientes que están presentes en el mucílago y cascarilla de cacao, por lo que, no se da el tratamiento necesario a estos residuos. Por medio de esta investigación, se brindará la información necesaria para que el mucílago y la cascarilla de cacao sean aprovechados en su totalidad en la industria alimentaria. Por la materia prima de la que proceden la cascarilla y el mucílago, se esperaría encontrar compuestos fitoprotectores como polifenoles y flavonoides (antioxidantes), en su composición. La importancia de aprovechar estos componentes se debe a que su función biológica principal es retrasar y aminorar los efectos negativos de la oxidación de las células, que aceleran el envejecimiento y enfermedades cardiovasculares.

Para esto se buscará identificar el perfil de fenoles simples, polifenoles y flavonoides presentes en el mucílago y cascarilla de cacao y relacionarlo con la actividad antioxidante. El objetivo principal de este trabajo es añadir estos componentes fenólicos en alimentos con un aporte calórico elevado o pobres en antioxidantes; mediante una alternativa tecnológica que permita conservarlos e incorporarlos en matrices alimentarias.

De esta manera se buscará desarrollar productos alimenticios que le aporten al organismo humano los antioxidantes necesarios para fortalecer el sistema de defensa que solo se puede suplir a través de la alimentación, ya que, estos no pueden ser generados de forma endógena.

## **CAPITULO II**

# **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Marco conceptual.**

### **2.1.1. Mucílago.**

Sustancia viscosa, de mayor o menor transparencia, que se halla en ciertas partes de algunos vegetales, o se prepara disolviendo materias gomosas en agua [15].

### **2.1.2. Cascarilla.**

Cubierta exterior de algunas semillas, como la de los cereales: café, cacao, almendras, etc. [16].

### **2.1.3. Antioxidantes.**

Los antioxidantes son una clase de moléculas encargadas de contrarrestar o prevenir que los radicales libres no dañen las células por la producción de efectos tóxicos en el organismo humano debido al desequilibrio de oxidantes y antioxidantes [17].

### **2.1.4. Microencapsulación de alimentos.**

Es uno de los métodos más importantes en la última década para la conservación de principios activos provenientes de compuestos naturales que son empleados como aditivos alimentarios. Existen diversos métodos para la producción de microcápsulas que se dividen en tres grupos: procesos físicos (secado por aspersion), procesos químicos (polimerización interfacial e inclusión molecular) y procesos fisicoquímicos (coacervación, liposomas y gelificación iónica) [18].

### **2.1.5. Compuestos bioactivos.**

Son aquellos compuestos químicos que ejercen un efecto benéfico para la función corporal del individuo, produciendo una mejora en la salud y bienestar o reduciendo un riesgo de enfermedad. Los compuestos que proceden de alimentos vegetales comestibles y exhiben propiedades farmacológicas son conocidos como fitoquímicos. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los: polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas y vitaminas (C, E); entre otros [19].

### **2.1.6. Cromatografía.**

Es el nombre que se le da a un grupo de técnicas utilizadas en la identificación de sustancias cuyo principio es la separación de diferentes componentes presentes en mezclas. Esta técnica es muy efectiva y por lo tanto se utiliza tanto a nivel de investigación como a nivel industrial; dependiendo de la técnica esta permite la purificación de compuestos [20].

### **2.1.7. Polifenoles.**

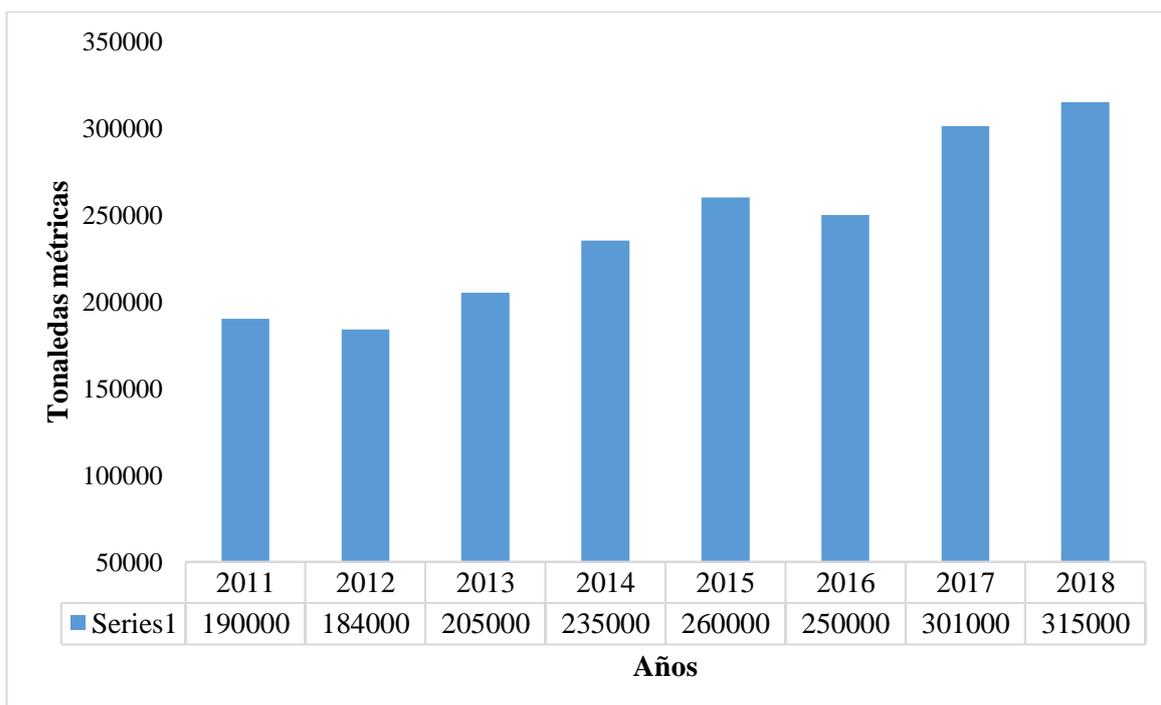
Los polifenoles son un grupo de compuestos bioactivos (ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides) ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal que forman parte importante de la dieta humana. Las frutas, verduras y bebidas producidas de plantas (té, café, vino tinto y jugos) representan las principales fuentes dietarias de polifenoles. Aunque también se encuentran en frutos secos, semillas, cereales y chocolate [21], [22].

## 2.2. Marco teórico.

### 2.2.1. Producción de cacao en Ecuador.

El cacao, es uno de los cultivos más antiguos que tiene el Ecuador, en el transcurso de la evolución de la comercialización este ha llegado a convertirse en un producto símbolo del país. La mayor parte del grano exportado por el país es considerada de calidad, caracterizándose por su labor y aroma especial [23]. Para lograr mantener el prestigio y aumentar la participación actual en el mercado internacional, el país debe invertir en la tecnificación de los cultivos a fin de alcanzar mayor productividad por hectárea cultivada. Además, se debe trabajar en la generación de valor agregado y los aspectos estratégicos de comercialización [24].

El cacao se cultiva en todas las zonas tropicales de Ecuador continental; sin embargo, la mayor producción está en las provincias de la Región Costa (84%) como: Manabí, Los Ríos, Guayas, Esmeraldas, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas. En la Región Sierra (8%) este fruto se cultiva en: Cotopaxi, Bolívar, Cañar. En la Región Amazónica (8%) se encuentran en las provincias de Orellana, Napo y Zamora Chinchipe [25].



**Figura 2.** Producción de cacao en Ecuador  
**FUENTE:** EL TELÉGRAFO (2019) [26].

De acuerdo a las estadísticas presentadas en la figura 2, la producción de cacao en el Ecuador ha ido incrementando paulatinamente; es así que, en el período 2011 - 2018 este aumentó un 60,32% (190000 a 315000 Tm); alcanzando el tercer lugar entre los países exportadores. Este fruto constituye una importante fuente de empleo y se estima que alrededor de 600000 personas están vinculadas directamente a la actividad; siendo un valioso aporte y de gran peso en la economía [27].

### **2.2.2. Cacao.**

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un árbol perteneciente a la familia de la Sterculiaceae, el cual es cultivado como un producto con fines económicos en la mayoría de países tropicales [28]. El cultivo florece en un régimen tropical cálido y húmedo (21-32 ° C), en tierras bajas hasta los 300 m.s.n.m. Las plantas son intolerantes a los vientos fuertes, sequias (menos de 3 meses) y condiciones estancadas o acumulación de agua. Para su desarrollo requiere suelos orgánicos (30-40% de arcilla) ricos en nutrientes, bien drenados, húmedos y profundos (1,5m) con un amplio rango de pH (6 a 7,5) [29].

#### **2.2.2.1. Variedades de cacao.**

En el mundo existe una gran cantidad de variedades, híbridos y clones de cacao, que se han originado a través del cruce de dos variedades principales: Criollo y Forastero. El cacao trinitario es una de las primeras variedades que surgieron de este cruzamiento; aunque la riqueza genética de este cultivo hoy en día es muy amplia [30]. A continuación, se detalla los principales materiales de cacao cultivados en el Ecuador:

### **Colección Castro Naranjal (CCN-51).**

El cacao CCN-51 es un híbrido obtenido por el Ing. Homero Castro en 1960, a partir de materiales como el ICS-95 x IMC-67. Luego de numerosos ensayos por lograr una variedad productiva y resistente, se liberó este material considerado el clon más productivo del mundo en la finca “Teobroma” (Naranjal, Provincia del Guayas). Las almendras de este tipo de cacao presentan características sensoriales como: sabor dulce y ácido, amargor medio que le da una sensación astringente y un aroma floral medio y frutal a nuez [31].



**Figura 3.** *Cacao CCN-51*

### **Nacional o fino de aroma.**

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) en el Ecuador existe un tipo de cacao único en el mundo conocido con el nombre de “Nacional”. Este se caracteriza por tener una fermentación muy corta y dar un chocolate suave de buen sabor y aroma, por lo que, es reconocido internacionalmente con la clasificación de “Cacao Fino y de Aroma”. A nivel sensorial, este tipo de cacao tiene características individuales distintivas, de toques florales, frutales, nueces, almendras y especias, que lo hace único y especial; sobresaliendo con su ya conocido “sabor Arriba” [32].



**Figura 4.** *Cacao Nacional*

Los frutos son leñosos en forma de haba alargada y aparecen sobre la copa de los árboles y debajo de sus ramas. Dependiendo del tipo de cruzamiento genético la cáscara pueden ser de color amarillo mostaza, blanco amarillento verde o rojo antes de la madurez fisiológica. El color del fruto se oscurece cuando esta empieza a madurar, tomando una tonalidad marrón. La fruta es alargada (10 a 32cm de longitud; 7 a 10 cm de diámetro ecuatorial), pesa entre 200 a 1000g en el interior contiene entre 20 y 60 millas dispuestas en 5 filas [33].

#### **Otras variedades de cacao:**

##### **Criollo o dulce.**

El cacao criollo o dulce es originario de Centroamérica, Colombia y Venezuela, se caracteriza porque el fruto posee una cascara suave. La superficie tiene alrededor de diez surcos profundos, acompañados de otros con menor profundidad. El fruto termina en una punta delgada con curvatura borroñosa o áspera. En la parte interna de la corteza del fruto es de color blanco amarillento, con ligeras pigmentaciones de color violeta. Las semillas o almendras del fruto son dulces y de esta variedad se elabora el chocolate denominado fino y de aroma [30].



**Figura 5.** *Cacao Criollo*

**Trinitario.**

El cacao trinitario es una variedad que surge del cruce entre materiales de tipo Criollo y Forastero. Las plantas son fuertes, de tronco grueso y hojas grandes y actualmente es la variedad más cultivada en el mundo. Las mazorcas son de muchas formas y colores; con una piel relativamente suave; sin embargo, se diferencia de las otras variedades por el color interno de la corteza (amarillo blanquecino). Las almendras son más grandes que las de otras variedades, de forma plana, de color púrpura y no está normalmente en punta dentro de la mazorca [30], [34].



**Figura 6.** *Cacao Trinitario*

### **Forastero o amargo.**

El cacao Forastero o amargo es originario de América del Sur, por lo que, es ampliamente cultivado en Brasil; aunque en la actualidad esta variedad de cacao ha sido propagada en África. Los frutos de cacao forastero poseen una cáscara dura, más o menos lisa, que va del color verde hasta el amarillo; dependiendo su estado de madurez. Son una apariencia redonda y las semillas son aplanadas de color morado y sabor amargo [30].



**Figura 7.** *Cacao Forastero*

#### **2.2.2.2. Composición química del grano del cacao.**

El cacao es uno de los productos agrícolas de mayor importancia en el mundo, debido a que los subproductos que se obtienen de las almendras del fruto presentan un gran valor nutritivo. Se lo considera como un superalimento debido a la capacidad antioxidante que le aportan los polifenoles presentes en su composición. Estos biocompuestos están vinculados con potenciales beneficios para la salud. Así también, posee otros compuestos orgánicos de utilidad farmacológica como Cafeína, Teofilina y Teobromina. Siendo este último un potente estimulante cardiovascular y del sistema nervioso central [35].

Además de los componentes fenólicos el cacao es rico en grasa, proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, minerales y alcaloides; como se detalla en la Tabla 1:

**Tabla 1.** *Composición química del grano de cacao*

<b>Componentes</b>	<b>Porcentaje * (%)</b>
Manteca de cacao	54,00
Proteína	11,50
Ácidos orgánicos y aromas	9,50
Celulosa	9,00
Ácidos tánicos y color	6,00
Agua	5,00
Sales minerales	2,60
Teobromina	1,20
Azúcares	1,00
Cafeína	0,20

\*Los resultados se reportan en base seca

**FUENTE:** ORTIZ-VALBUENA K, ÁLVAREZ-LEÓN R (2015) [36].

### **2.2.2.3. Cadena del beneficiado del cacao.**

Los mercados internacionales especialmente la Unión Europea, cada día exigen mayor calidad. A pesar de las características de aroma y sabor están relacionados en primera instancia con el origen de los granos, el procesamiento postcosecha o de beneficiado del cacao es también una etapa decisiva en la calidad de las almendras. Este se divide en diferentes etapas como recolección, partida de mazorcas o quiebre, desgranado, fermentación, secado, limpieza y clasificación. Cuidar los procesos de fermentación y secado garantiza que la calidad de las almendras sea apetecida por la industria chocolatera a nivel nacional e internacional, a un buen precio [37], [38].

### **Cosecha, selección y apertura de mazorcas.**

La cosecha o recolección de las mazorcas de cacao se recomienda realizar cuando éstas han alcanzado un punto de madurez fisiológica; 5 a 6 meses después de floración. Esto se puede diferenciar de forma visual porque las variedades que presentan frutos verdes antes de la maduración, se tornan de color amarillo; mientras que, las que presentan frutos o vino tinto se toman un color rojo intenso o anaranjado [39]. Para evitar la acumulación de frutos en la planta se recomienda recolectar todas las mazorcas maduras, sobremaduras, dañadas por plagas y enfermedades al menos cada quince días [40].

Después de la recolección las mazorcas se clasifican en dos grupos; en el primer grupo se colocan los frutos maduros, pintones y sanos. Mientras que, el segundo grupo está compuesto por mazorcas sobremaduras, enfermas, dañadas y con plagas. Las mazorcas de cada grupo se parten por separado y sus granos se fermentan, secan y venden por separado; puesto que solo las mazorcas maduras y sanas se fermentan bien y sirven para obtener almendras de primera calidad [41].

El partido o quebrado de la mazorca se debe hacer con un machete corto para no herir o partir las almendras. La extracción del grano en baba, se realiza deslizando los dedos a lo largo de ambos lados de la placenta para desprenderlas; este proceso debe realizarse de preferencia el mismo día o máximo 2 días después de la cosecha [41].

### **Fermentación.**

La fermentación es el proceso responsable de la calidad del cacao, del cual dependerá las características del chocolate. Para esto, se requiere de lugares acondicionados y bien ventilados, donde no se almacenen materiales extraños (combustibles, agroquímicos u otros contaminantes), ni se permita el ingreso de animales. Si este proceso se realiza de forma deficiente, se obtiene cacao corriente o de baja calidad [42].

Dependiendo el nivel de tecnificación, la fermentación se realiza por diferentes métodos como: montones, sacos, cajas y tendales.

**Tabla 2.** Métodos de fermentación de cacao empleados en Ecuador

<b>MÉTODO</b>	<b>PRODUCTOR</b>	<b>PROCESO</b>	<b>REMOCIÓN</b>
Montones	Pequeños y medianos agricultores	Amontonar los granos sobre piso de madera. El jugo o mucílago exudado se escurre a través de canales	Cada 24 horas
Sacos	Pequeños agricultores	Almacenamiento en sacos de plástico o yute, de 3 a 5 días	Cada 24 horas
Tendales	Pequeños agricultores	Amontar cacao en pilas largas cubriéndolas con hojas de plátano o bijao durante varios días	Cada 24 horas
Cajas	Empresas	Almacenamiento en cajas de maderas blancas no resinosas (laurel) de 90 cm de altura y 80 a 120 cm de ancho	Hasta que los granos estén completamente escurridos.

**FUENTE:** PINTO-MOSQUERA N (2011) [42].

### **Secado.**

Al finalizar el proceso de fermentación los granos deben ser secados y acondicionados usando métodos naturales o industriales donde el grano perderá el agua, ácido acético y algunos compuestos astringentes. Por ningún motivo se deben extender los granos de cacao sobre patios de cemento, áreas asfaltadas o a la orilla de la carretera. Esto provoca la contaminación de las almendras por humo de automotores, polvo, arenillas y partículas de basura [43].

**Tabla 3. Métodos de secado de cacao**

<b>TIPO DE SECADO</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>PROCESO</b>	<b>PRECAUCIÓN</b>
Natural (sol)	Tablas de madera, esteras de bambú o caña brava (caña verde) separado del piso	Extender los granos sobre una superficie natural, limpia y remover cada 20 o 30 minutos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Impedir la presencia de animales.</li><li>• Evitar el desarrollo de levaduras, bacterias y mohos.</li><li>• Proteger los granos de la lluvia.</li></ul>
Asistido con horno	Placas de acero inoxidable con sistema de calentamiento a gas	El secado y acondicionado finaliza cuando el grano alcanza una humedad entre 6,5 a 7%, con remoción constante.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Enfriar a temperatura ambiente sin discontinuar la remoción.</li><li>• Evitar condensación y reabsorción de humedad</li><li>• Evitar el desarrollo de microorganismos en la parte externa o interna del grano</li></ul>

**FUENTE:** AGUILAR-H (2017) [43].

El secado debe realizarse de forma controlada, si los granos están húmedos o parcialmente despulpados existe la probabilidad de formación de Ocratoxina, que es altamente dañina para la salud. A nivel sensorial puede desarrollarse un sabor desagradable por oxidación de las grasas [43].

### **Tostado o torrefacción.**

El tostado del cacao es un proceso que facilita la eliminación de la cascarilla y el tiempo de proceso dependerá de la variedad de cacao, tamaño de las almendras y espesor de la cascarilla [44]. Para el cacao Criollo, se recomienda un proceso de tostado a temperaturas entre 110 y 115 °C, por un período de 10 a 20 minutos. El cacao Forastero y Trinitario se tuesta a temperaturas superior (120 a 130 °C), por un período de tiempo de 25-30 minutos [45].

La temperatura correcta de tostado tiene importancia porque influye sobre la reacción de Maillard, un proceso químico que al promover la combinación de los azúcares reductores y proteínas generan olores y sensaciones típicas del sabor a chocolate. Además de otras notas sensoriales como el flavor floral, frutal y nuez [44].

### **Descascarillado.**

Es el proceso en el que se elimina la cascarilla o cubierta exterior de la semilla del cacao. Esto debe realizarse de manera obligatoria antes de la transformación de la materia prima en subproductos como pasta o licor de cacao, chocolate, polvo de cacao y manteca de cacao [46].

### **2.2.3. Valorización de los residuos.**

Durante las últimas décadas, los avances tecnológicos en el cultivo de cacao nos acompañaron el aumento de la tasa de consumo; por lo que, existe una preocupación social y ambiental que está atrayendo el interés de los diversos actores en la cadena de producción y suministros de cacao. En el año 2017, se empezó a exportar residuos provenientes de la cadena de beneficio del cacao como cáscaras, cascarilla, mucílago y otros desechos; alcanzando un ingreso de 244 millones de dólares en países como Costa de Marfil y Sierra Leona [47].

Los principales importadores fueron los Países Bajos, España y Malasia. Estas cifras sugieren que las empresas de todo el mundo están aprovechando estos materiales residuales para desarrollar diversos productos en una escala industrial, donde se aprovechan los compuestos bioactivos responsables de la función antioxidante, antitumoral y antiviral. Sin embargo, la aplicabilidad de la biomasa residual de cacao ha sido estudiado ligeramente [47].

### 2.2.3.1. Mucílago de cacao.

El mucílago de cacao es considerado como residuo agroindustrial proveniente de la pulpa fermentada que rodea a la semilla de cacao. Antes de la fermentación es una pulpa aromática, azucarada y ácida, compuesta por células esponjosas parenquimatosas, rica en polisacáridos, celulosa, gomas y pectinas. La mayoría de los agricultores y asociaciones cacaoteras del Ecuador, desperdician más de 40 litros por cada 800 kilogramos de semillas frescas, sin darle un uso productivo [48]–[50].

La pulpa mucilaginososa está compuesta por agua, proteína, azúcares, glucosa, pectinas, ácidos orgánicos y cenizas; como se detalla en la Tabla 4.

**Tabla 4.** *Composición química del mucílago de cacao*

Componentes	Porcentaje * (%)
Agua	79,2 – 84,2
Proteína	0,09 – 0,11
Azúcares	12,50 – 15,9
Glucosa	11,6 – 15,32
Pectinas	0,9 – 1,19
Ácido cítrico	0,77 – 1,52
Cenizas	0,40 – 0,50

\*Los resultados se reportan en base húmeda

**FUENTE:** : ORTIZ-VALBUENA K, ÁLVAREZ-LEÓN R (2015) [36].

El exudado o pulpa de cacao tiene un delicioso sabor tropical, el cual ha sido usado en la elaboración de diferentes productos como: jalea de cacao, alcohol y vinagre, nata, pulpa procesada. Su pulpa puede ser consumida fresca en forma de jugos o batidos, helados o yogures [51].

### 2.2.3.2. Cascarilla de cacao.

La cascarilla de cacao es un proceso o residuo que se obtiene después del proceso de tostado o torrefacción. Este material fibroso, seco, crujiente, de color marrón y con un olor similar al del chocolate, representa un 12% en peso de la semilla.

A pesar de ser un desecho agroindustrial, nutricionalmente aporta macronutrientes (proteínas, carbohidratos, lípidos) y micronutrientes (vitaminas y minerales); siendo una fuente energética de bajo contenido calórico [52]. Los valores de la composición de la cascarilla de cacao se muestran en la Tabla 5:

**Tabla 5.** *Composición química de la cascarilla de cacao*

Composición	%
Humedad	5,4 – 15,3
Proteína cruda	6,3 – 10,4
Fibra cruda	23,4 – 36,2
Componentes del extracto etéreo	0,5 – 2,4
Extracto libre de nitrógeno	31,8 – 61,4
Cenizas	6,0 – 10,8

**FUENTE:** TAPIA-YÁNEZ (2015) [53].

La cascarilla de cacao tiene potencial como subproducto de la industria del chocolate, debido a que esta se puede utilizar incluso sin realizar ninguna modificación. Además de su contenido de fibra, posee compuestos fenólicos que pueden ser aprovechados como aditivos o componentes activos en el desarrollo de nuevos productos de la industria de alimentos [54].

Actualmente esta ha sido utilizada en agricultura, nutrición animal y producción de energía, elaboración de infusiones aromáticas, extracción de pectinas, jaleas, mermeladas y saborizantes. Sin embargo, en el Ecuador el proceso de gestión de residuos y el aprovechamiento de subproductos de la industria aun es insipiente; por lo que, se buscan alternativas de producción más respetuosas con el medio ambiente [55], [56].

#### **2.2.4. Industrialización del cacao.**

La industrialización del cacao consiste en una serie de etapas que buscan darle valor agregado a este fruto. Los productos más comunes son chocolates, licor, pasta, manteca, torta, polvo entre otros. En Ecuador, existen aproximadamente diez empresas dedicadas al procesamiento del cacao para la obtención de semielaborados. Las industrias pequeñas más reconocidas están ubicadas en el cantón Pichincha, provincia de Manabí empresas como: La Perla, Rualdos, Merelitt, Chocolateca. En la provincia del Guayas se encuentran empresas como Colcacao, Edeca, Incacao. Las grandes industrias dedicadas a la elaboración de productos son Ecuacocoa, la Universal, Navolli S.A, Triari S.A, Nestlé Ecuador, entre otras [57].

#### **2.2.5. Compuestos bioactivos.**

Por definición, los compuestos bioactivos son constituyentes nutricionalmente esenciales y no esenciales, que se producen en pequeñas cantidades en los alimentos. Su consumo genera en la salud humana efectos antiinflamatorios y la prevención de enfermedades cardiovasculares [47].

#### **2.2.6. Polifenoles.**

Los polifenoles son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetales. Su efecto benéfico en la salud se debe a que estos compuestos pueden modular la actividad de diferentes enzimas e interferir en procesos celulares, donde participan en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción; de ahí su nombre de antioxidante [21].

Existen varias clases y subclases de polifenoles que definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son los ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxixinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides [21].

Las catequinas son el tipo más común de compuestos flavan-3-ol presentes en muchas plantas alimenticias; donde aportan en efecto astringente en la boca, después de comer cacao o chocolate, té, arándanos y vino [58].

Las antocianinas se encuentran ampliamente en alimentos de origen vegetal siendo responsables de la coloración de frutos y flores. En vinos añejos son los responsables del color rojo, junto con los taninos. Por esta razón son utilizadas en la industria de alimentos como colorantes naturales, bajo el código E169 [58].

Los taninos forman parte del grupo de Proantocianidinas, presentan estructuras poliméricas compuestas por la unión de flavonoides. Se encuentran en abundancia en la naturaleza formando mezclas complejas, por lo que, son responsables en gran medida de la textura, color y sabor astringente y amargo de algunos alimentos como té, café o chocolate [59].

### **2.2.7. Perfil de polifenoles.**

El termino de perfil de polifenoles se emplea para describir el tipo de polifenoles que están presentes en las almendras de cacao; llegando a representar el 20% de su masa. Los polifenoles más comunes en el cacao son los flavan-3-ols (37%), Epicatequina (35%) y oligomeros (58%) formados por la unión de varios monómeros como la (+)-Epicatequina y la (-)-Epicatequina conocidos como Procianidinas [60], [61].

#### **2.2.7.1. Polifenoles en la salud.**

El consumo de cacao y sus derivados ha despertado en los últimos años un mayor interés, atribuyéndose potenciales efectos beneficiosos sobre la salud, por su alto contenido de polifenoles. Numerosos estudios epidemiológicos recientes, ponen de manifiesto la asociación entre el consumo de polifenoles en la dieta y la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, enfermedades cardiovasculares, procesos carcinogénicos, enfermedades neurodegenerativas, inhibición de la trombosis arterial, actividad antiinflamatoria, reducción del colesterol total y lipoproteína de baja densidad [62].

### **2.2.8. Flavonoides.**

Los flavonoides son sustancias producidas como metabolitos secundarios por las plantas, cuyo elemento estructural común es la existencia de un esqueleto de difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano. Sobre este esqueleto pueden darse miles de sustituciones, lo que origina las diferentes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas y proantoncianidinas), antocianidinas, chalconas, auronas e isoflavonas [63].

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en cantidad variable en frutas rojas (fresas, zarzamoras), cítricos, verduras, semillas (nueces), especias y varias plantas medicinales. Así como en bebidas derivadas de vegetales entre las que se encuentran: té, infusiones, mosto, cacao, zumos y vino [63].

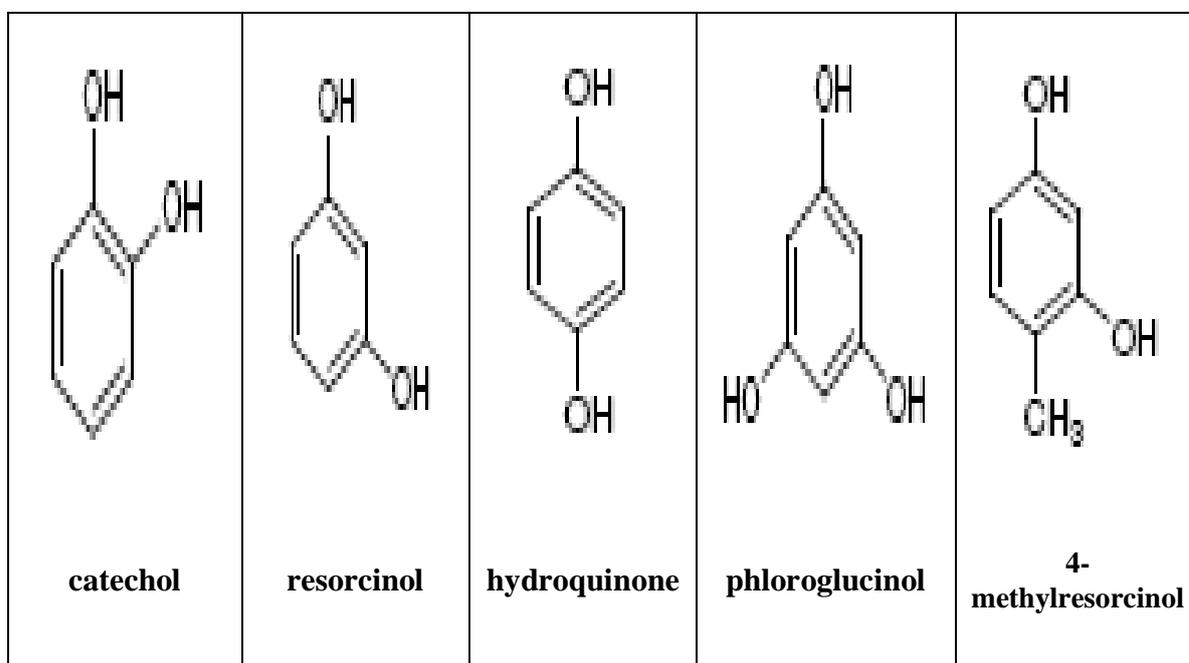
#### **2.2.8.1. Flavonoides en la salud.**

Los flavonoides son compuestos que poseen una amplia gama de actividades farmacológicas entre las que destacan sus propiedades antioxidantes. Por lo que, tienen capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo relacionado con patologías asociadas al envejecimiento, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. El consumo promedio de flavonoles y flavonas dependen de los hábitos nutricionales y de las zonas geográficas calculando que la ingesta esta alrededor de 20 a 25 mg [64].

### **2.2.9. Fenoles simples.**

Los fenoles son compuestos químicos ampliamente distribuidos en las plantas como producto de su metabolismo secundario. Algunos de estos compuestos son indispensables para el funcionamiento de dichas plantas y otros son útiles en los mecanismos de defensa bajo situaciones de tensión y contra el ataque de organismos patógenos [65].

Los fenoles simples son compuestos que tienen dos o tres grupos hidroxilo en el anillo aromático en las posiciones 1,2 1,3 o 1,4 y en las posiciones 1,3,5 o 1,2,3; respectivamente. Son derivados del resorcinol con propiedades anfifílicas, en su mayoría presentes en muchos cereales. Además de sus propiedades antioxidantes existen pruebas de que los compuestos fenólicos tienen una actividad biológica importante, como los antibióticos o antiparasitarios [58].



**Figura 8.** Estructuras químicas de compuestos fenoles simples

FUENTE: PEÑARRIETA-M, TEJEDA-L, MOLLINEDO-P, VILA-J, BRAVO-J (2014) [58].

### 2.2.10. Capacidad antioxidante.

El organismo utiliza mecanismos de protección para responder al efecto dañino de los radicales libres mediante un sistema de defensa formado por agentes antioxidantes. La capacidad antioxidante se define como el potencial de una molécula para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Al interactuar con un radical libre estos agentes antioxidantes ceden un electrón, oxidándose y volviéndose un radical libre; débil y carente de toxicidad. Entre sus funciones principales están prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS); además de reparar o eliminar el daño. Esto eleva la resistencia a ataques oxidativos y la transformación de metabolitos reactivos en moléculas menos reactivas [66].

### **2.2.11. Microencapsulación de compuestos bioactivos.**

La microencapsulación (ME) es una técnica que permite la incorporación de ingredientes alimentarios en pequeñas cápsulas. Se la aplica en el campo de alimentos para preservar el contenido nutricional (antioxidantes y vitaminas) y coadyuvar con una liberación controlada de sabores, aromas y acidulantes en las matrices alimentarias. Además, facilita la liberación oportuna de aditivos, asegurando la dosis óptima y mejorando la rentabilidad para el fabricante de alimentos [67].

Las aplicaciones de esta técnica han ido incrementándose en la industria de alimentos, debido a la protección que ofrecen a los materiales encapsulados de factores como calor y humedad; permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. La encapsulación de enzimas y microorganismos permite su fácil manejo, reutilización y recuperación a grandes escalas en los procesos industriales [68].

### **2.2.12. Alimento funcional.**

El carácter de alimento funcional se le atribuye aquellos productos que presentan determinados compuestos bioactivos o fitoquímicos. En los vegetales, intervienen en el metabolismo secundario de las plantas como reguladores del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos, atracción de polinizadores y dispersión de semillas. Algunos de ellos son responsables de las características organolépticas de los alimentos, como pigmentos y sustancias aromáticas [69].

## **2.3. Marco referencial.**

Para la ejecución de este proyecto de investigación se tomó como referencia diferentes trabajos publicados en revistas científicas, repositorios digitales y bibliotecas virtuales como se detalla a continuación:

De acuerdo con el capítulo del libro *Saving Food* publicado por Plazzotta y Manzoco, la valorización del desperdicio de alimentos incluye diferentes estrategias de gestión, que buscan convertir los desechos en productos de alto valor agregado para la industria de alimentos y otros sectores. Según estos autores, para que un residuo sea usado para la elaboración de subproductos debe cumplir con una serie de requisitos. Es así que, la

sustancia debe ser parte integral de un proceso de producción y su uso posterior debe ser seguir, de adición directa y sin otro procesamiento que no sea la practica industrial normal. Además, debe cumple con los requisitos legales en términos de medio ambiente, seguridad y calidad [9].

Según el trabajo publicado por Nayak y Bhushan, las tendencias recientes sobre las técnicas de valorización de los desechos de alimentos están enfocados a la búsqueda de tecnologías para la generación de subproductos de valor agregado como biocombustibles, biomateriales, componentes bioactivos y adsorbentes de base biológica. En esta investigación publicada en el *Journal of Environmental Management* se ha realizado un análisis de los desafíos y obstáculos que se enfrentan los científicos industriales durante el procesamiento de bioproductos a partir de desechos. La principal dificultad para la generación exitosa y de alto rendimiento de los subproductos, es la complejidad y variabilidad de la composición química de los residuos alimenticios, junto con su alto contenido de humedad inherente. Por lo que, dificulta la implementación de tales tecnologías a escala industrial [8].

De acuerdo al trabajo publicado por Kazemi y colaboradores en el *Jornal Waste Management*, en la valorización integral de los residuos industriales de la berenjena se puede recuperar de forma simultánea subproductos como pectina, compuestos fenólicos y pululano (biomateriales). Estos autores manifiestan que la extracción de pectina y compuestos fenólicos se puede realizar de forma conjunta en medio ácido. Mientras que, para la obtención de pululano las sobras sólidas de primer proceso se hidrolizan enzimáticamente, y luego se llevan al proceso de fermentación de *Aureobasidium pullulans* [70].

Para Naziri y sus colaboradores las prácticas de valorización de los residuos y subproductos alimentarios es un medio de gestión sostenible que puede generar beneficios para las economías locales. En su estudio publicado en el *Journal Food Research International*, estos autores evaluaron las alternativas presentadas por la academia y las instituciones de investigación que buscan contribuir al objetivo de una sociedad de cero residuos, establecido por la Unión Europea hasta 2025. Según estos autores Macedonia Central es una región griega con una importante actividad agroindustrial de aceite de oliva, vino y arroz, que generan tipos y cantidades de subproductos. Estos pueden aprovecharse empleando herramientas químicas y biotecnológicas para la recuperación y producción de compuesto de alto interés para la industria alimentaria [71].

Para Grillo y sus colaboradores la aplicación de procesos sin desperdicio y la valorización de residuos de alimentos forman parte de economía circular y actualmente es uno de los temas más candentes en la investigación de sostenibilidad. Según su trabajo publicado en el *Journal Food Research International*, el uso de la cascarilla de cacao es parte de una estrategia cero residuos, donde se busca valorizar uno de los principales subproductos del proceso de tostado de las almendras de cacao. Para esto proponen mejorar la extracción efectiva de compuestos de alto valor agregado mediante protocolos verdes como ultrasonido (US) y cavitación hidrodinámica (HC). Al comparar estas nuevas tecnologías con métodos convencionales, se determinó que la HC promueve sustancialmente la de construcción rápida de biomasa con bajo consumo de energía. Cuando se incorpora una mezcla ternaria de agua/etanol/hexano se puede obtener un producto hidrófilo, rico en metilxantinas y polifenoles (catequinas y epicatequinas), Teobromina, cafeína y manteca de cacao [72].

Según el trabajo desarrollado por Lujano y sus colaboradores (2017), el cacao es un alimento que presenta un alto contenido de polifenoles. De acuerdo con el artículo publicado en la Revista Ingeniería UC, la concentración de estos compuestos puede variar dependiendo de su origen geográfico y las condiciones de procesamiento postcosecha; encontrándose un alto contenido de flavanoles como la (+)-catequina ( $1,75 \pm 0,16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y Procianidina B<sub>2</sub> ( $11,44 \pm 1,74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en muestras procedentes de Ocumare (Venezuela). Por su actividad antioxidante, estas sustancias presentan propiedades terapéuticas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras afecciones asociadas a la acción de radicales libres [73].

Yépez en el año 2017, caracterizó el perfil de polifenoles en cacao CCN-51 de las principales zonas productoras del Ecuador (Los Ríos, Guayas y Manabí). La cuantificación e identificación de los polifenoles se realizó utilizando 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 B<sub>1</sub> ( $0,88 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Procianidina B<sub>2</sub> ( $6,42 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Procianidina C<sub>1</sub> ( $4,16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y epicatequina ( $13,58 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), mientras que la provincia de Los Ríos presentó mayor concentración de catequina ( $2,81 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) [60].

## **CAPÍTULO III**

# **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1. Localización.

El proceso de análisis fisicoquímico y funcional del mucílago y cascarilla de cacao, y la elaboración de los microencapsulados se realizó con la colaboración de diferentes instituciones, cuya localización se detalla en la Tabla 6.

**Tabla 6.** *Localización del trabajo experimental*

<b>INVESTIGACIÓN</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>
<b>Preparación de la muestra</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Recolección, fermentación y secado: Asociación “La Cruz”, Mocache, Los Ríos.</li><li>• Torrefacción y Descascarillado: Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quevedo, Los Ríos.</li></ul>
<b>Identificación del perfil fenólico</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Mejía, Pichincha.</li></ul>

### 3.2. Tipo de investigación.

Para la fundamentación teórica del estudio se aplicó investigación cuantitativa a través de un trabajo de revisión bibliográfica que permitió analizar el fenómeno de manera directa mediante técnicas experimentales específicas, como se detalla a continuación:

#### 3.2.1. Investigación descriptiva.

A partir de la investigación descriptiva se determinó las relaciones y aspectos de los fenómenos en estudio, lo que permitió conocer las variables y señalar lineamientos del estudio propuesto [74].

#### 3.2.2. Investigación exploratoria.

Mediante la investigación exploratoria se integró teorías que permitieron explicar los fenómenos de estudio; recaudando información para reconocer, ubicar y definir el problema.

De igual manera se fundamentó la hipótesis y se estableció el esquema y la metodología experimental definitiva de la investigación [74].

### **3.2.3. Investigación experimental.**

La relación entre las variables de estudio se determinó a través de un modelo o diseño experimental que permite predecir desde el punto de vista probabilístico los fenómenos de relación entre las variables independiente y dependiente [74].

## **3.3. Métodos de la investigación.**

### **3.3.1. Método inductivo-deductivo.**

Para la ejecución del trabajo de investigación se aplicó el método inductivo-deductivo, donde la obtención de resultados se obtuvo a partir de un problema de investigación como es la acumulación de residuos de la industria cacaotera y chocolatera. Este método permitió hallar posibles soluciones para el aprovechamiento industrial de los componentes bioactivos de la cascarilla y mucílago. Además de brindar conocimientos que permitan establecer las condiciones tecnológicas adecuadas y los parámetros físicoquímicos apropiados para la valorización de estos residuos [74].

### **3.3.2. Método experimental.**

A través del método experimental se trabajó sobre las variables de estudio; para esto se observaron los resultados del perfil fenólico y se compararon con la capacidad antioxidante del mucílago y cascarilla de cacao [74].

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

Para la ejecución del trabajo de investigación se emplearon dos tipos de fuentes de recopilación de información.

Para el planteamiento del proyecto de investigación y el desarrollo del anteproyecto se trabajó en la recolección de información de fuentes secundarias, empleando libros y revistas científicas, como:

- REDCieN- Ciencia y Nutrición
- Fundación de Investigación Agrícola
- Research Trends in Cocoa
- Ars Pharmaceutica
- ABA Journal
- Progress in Food Chemistry
- Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias
- Journal of Environmental Management
- Saving Food

Así también se emplearon trabajos presentados en los repositorios de las diferentes universidades y escuelas politécnicas del Ecuador donde se reportan las tesis de grado y maestrías realizadas en cacao, derivados y residuos.

Una vez que se dispuso de toda la información bibliográfica se procedió a recopilar información de fuentes primarias mediante el trabajo de campo. Donde se realizó la identificación del perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao.

### **3.5. Diseño de la investigación.**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la variedad en los perfiles polifenólicos y las metilxantinas, de la cascarilla y el mucílago de cacao se aplicó la prueba “t” de student (Tabla 7). Planteándose las siguientes hipótesis experimentales:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$     **H<sub>0</sub>**: No existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico y el contenido de metilxantinas de mucílago y cascarilla de cacao.
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$     **H<sub>1</sub>**: Existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico y el contenido de metilxantinas de mucílago de cacao.

La combinación de los tratamientos para la evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico y el contenido de metilxantinas de mucílago de cacao, se presenta en la Tabla 7.

**Tabla 7.** *Combinación de tratamientos para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico del mucílago de cacao.*

<b>Replicas</b>	<b>Cacao CCN-51</b>	<b>Cacao Nacional</b>
1	$Y_{11}$	$Y_{21}$
2	$Y_{12}$	$Y_{22}$
3	$Y_{13}$	$Y_{23}$

Las determinaciones se realizaron a un nivel de confianza de 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

### **3.5.1. Esquema del ANDEVA.**

En la Tabla 8 se presenta el esquema del ANDEVA para la prueba “t” de Student de dos muestras emparejadas. Mediante el estadístico “t” de Student, se evaluó el efecto de la variedad de cacao en la actividad antioxidante de las muestras de mucílago de cacao en estudio.

**Tabla 8.** Prueba *t* de student (dos muestras emparejadas) para evaluación del efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico del mucílago de cacao.

	Cacao CCN-51	Cacao Nacional
Media	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$	$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$
Varianza	$S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$	$S^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$
Número 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	$-t_{\alpha, n=t_{1-\alpha, n}}$	$-t_{\alpha, n=t_{1-\alpha, n}}$
Valor crítico de t (una cola)	$(-t_{0,01,9}, \infty)$	$(-t_{0,01,9}, \infty)$
p(T<=t) dos colas	$(-t_{\frac{\alpha}{2}, n-1}, t_{\frac{\alpha}{2}, n-1})$	$(-t_{\frac{\alpha}{2}, n-1}, t_{\frac{\alpha}{2}, n-1})$
Valor crítico de t (dos colas)	$(-t_{0,01,9}, \infty)$	$(-t_{0,01,9}, \infty)$

Para el análisis estadístico de la cascarilla de cacao se realizó el mismo tratamiento estadístico que en el mucílago de cacao, como se muestra en las Tablas 7 y 8. Para la comparación de resultados se plantearon las siguientes hipótesis:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$  **H<sub>0</sub>**: No existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico y el contenido de metilxantinas cascarilla de cacao.
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$  **H<sub>1</sub>**: Existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil fenólico y el contenido de metilxantinas de cascarilla de cacao.

### 3.5.2. Análisis de correlación.

Para el análisis de correlación canónica (Tabla 9), se ingresó las variables en dos conjuntos. El primer conjunto estuvo compuesto por las concentraciones de 3-flavan-ols y metilxantinas (Procianidina B<sub>1</sub>, Procianidina B<sub>2</sub>, Procianidina C<sub>1</sub>, Epicatequina, Catequina, Caféina y Teobromina) de los residuos de cacao y en el segundo conjunto agrupo los valores de capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC. Aquí se buscaron el número de correlaciones canónicas que sean significativamente diferentes de cero, a través de estas correlaciones se pudo establecer la relación existente entre el contenido de antioxidantes de los coproductos de cacao, con su capacidad antioxidante.

**Tabla 9.** Matriz de correlación para relacionar el perfil fenólico (polifenoles y flavonoides) del mucílago de cacao con la actividad antioxidante

PERFIL DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE				
	Catequina (v)	Epicatequina (w)	Procianidinas (x)	Caféina (y)	Teobromina (z)
ABTS (x)	$r_{xv}$	$r_{xw}$	$r_{xx}$	$r_{xy}$	$r_{xz}$
FRAP (y)	$r_{yv}$	$r_{yw}$	$r_{yx}$	$r_{yy}$	$r_{yz}$
ORAC (z)	$r_{zv}$	$r_{zw}$	$r_{zx}$	$r_{zy}$	$r_{zz}$

### 3.6. Instrumentos de la investigación.

Los instrumentos que se aplicaron en la presente investigación son las siguientes:

#### 3.6.1. Muestreo.

El muestreo se realizó escogiendo al azar arboles de cacao nacional Fino de Aroma y CCN-51 de la colección de la Asociación “La Cruz” del cantón Mocache, provincia de Los Ríos. A partir de esto se realizó el proceso de beneficiado del cacao, de donde se obtuvieron los residuos empleados como material de estudio (mucílago y cascarilla de cacao) de cada una de las variedades por separado. Para la obtención de la muestra, se emplearon 45 kg de cada variedad de cacao.

### **3.6.2. Fermentación y secado del cacao.**

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

En cacao Nacional la fermentación se realizó durante 4 días (96 horas) manteniéndose 2 días en el cajón superior, 1 día en el cajón intermedio y 1 día en el cajón inferior; mientras que, para cacao CCN-51 la fermentación se realizó durante 6 días (144 horas) durante 2 días en cada cajón. Para asegurar un proceso adecuado de fermentación se realizó la remoción del grano cada 24 horas y un volteo de la masa cada 48 horas [75].

Durante la fermentación se recogieron las muestras de mucílago exudadas o lixiviadas de las almendras por la base de cada caja, en bolsas herméticas (ziploc) aislados de la luz y el oxígeno. Posteriormente cada muestra fue almacenada en congelación a una temperatura de -18°C.

Las almendras fermentadas se secaron al sol durante 7 días hasta obtener una humedad aproximada de 7%. Luego de esto, el grano se llevó a un tostador de placas, donde se realizó la torrefacción de las almendras durante 45 min. Las muestras de cascarilla de cada variedad de cacao se obtuvieron con ayuda de un descascarillador mecánico (10 a 20 min). Tanto la fase de tostado como el de descascarillado se realizaron en la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP [75].

### **3.6.3. Preparación de las muestras.**

Para las determinaciones analíticas, las muestras de cascarilla de cacao fueron molidas y almacenadas en recipientes herméticos; aislados de la luz, humedad y oxígeno, para su posterior caracterización fisicoquímica y funcional, extracción de componentes bioactivos y microencapsulación. Las muestras de mucílago fueron previamente descongeladas a temperatura ambiente (18° C) aisladas de la luz, humedad y oxígeno para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos.

### **3.6.4. Extracción de compuestos bioactivos.**

#### **3.6.4.1. Componentes fenólicos**

- **Mucílago**

En el caso del mucílago del cacao se realizó diferentes pruebas a partir de las cuales se determinó que las medidas analíticas deben realizarse en muestra fresca. Para la determinación de componentes fenólicos de cacao se sometieron las muestras de cada variedad a un proceso de centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos con ayuda de una centrifuga SIGMA (modelo 4-16Ks, Alemania).

El extracto se filtró luego a través de una membrana Millipore PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$  y se colocó en un vial con tapón de rosca para su posterior análisis.

- **Cascarilla**

La extracción de compuestos fenólicos (flavan-3-ols), Catequina (CAT), Epicatequina (EPI) y Procianidinas (PCN) B<sub>2</sub> y Procianidinas C<sub>1</sub> de la cascarilla de cacao se extrajeron siguiendo el método Samaniego y colaboradores (2020). Para esto se pasaron 0,3g de cada muestra por separado en tubos de centrífuga de 15 mL y se añadieron 3 mL de solución de acetona/agua/ácido fórmico (70/30/0.1, v/v/v). Las muestras se sometieron a un proceso de extracción combinando agitación, inmersión en baño ultrasónico y centrifugación. La agitación se realizó durante 3 minutos en un agitador Mistral Multi-Mixer (Melrose Park, EE.UU.). Posteriormente la muestra se llevó durante 10 minutos a un baño de ultrasonido (Cole-Parmer modelo 8892; Chicago, EE. UU), para luego ser llevada a centrifugación durante 10 minutos a 5500 rpm (2706 xg) en una centrífuga refrigerada (5°C) marca división Damon / IEC (Needham Hts, MA, EE.UU.). El sobrenadante obtenido se separó y se pasó a un matraz volumétrico de 25 mL. Este proceso se repitió 3 veces más y la muestra se enrazó con la solución de extracción. El extracto se filtró luego a través de una membrana Millipore PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$  y se colocó en un vial con tapón de rosca para su posterior análisis.

#### **3.6.4.2. Teobromina (TBR) y cafeína (CAF)**

La determinación de TBR y CAF se realizó en muestras de 0,3g de muestra de mucílago y cascarilla de cacao (Espín y Samaniego, 2018). Para la extracción de las metilxantinas las muestras se hirvieron durante 30 minutos en 100 mL de agua desionizada hasta que el volumen se reduzca a la mitad (50 mL). Luego, se añadieron 1 mL de solución Carrez 1 (15% p/v de hexacianoferrato de potasio) y Carrez 2 (30% p/v de sulfato de zinc) tanto en las muestras de mucílago como de cascarilla. El extracto obtenido se filtró inmediatamente a través del papel de filtro Whatman No. 4 en un matraz volumétrico de 100 mL. El extracto se enfrió y se llevó a volumen y se enrazó con agua desionizada. Para la identificación y cuantificación se pasó una alícuota del extracto a través de una membrana Millipore PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  y se colocó en un vial con tapón de rosca para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

#### **3.6.5. Cuantificación del perfil fenólico.**

La determinación del contenido de flavan -3-ols; se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) empleando equipo HPLC Agilent Technologies serie 1100/1200 (Waldbronn, Alemania), con detector DAD (280 nm). La separación se realizó utilizando una columna Agilent Eclipse XDB C18 (250 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ). Para el análisis, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra en el equipo (autoinyector G1329A) y se fueron eluyendo, a un caudal de 0.8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  utilizando dos fases móviles a una temperatura de 35 °C. La fase móvil A estuvo compuesta por acetonitrilo/agua/ácido fórmico (99/0,8/0,2 v/v/v) y la fase móvil B por acetonitrilo. Para la elución de la fase móvil A se realizó en isocrático; mientras que, la fase móvil B se diluyó en gradiente desde 5 al 100% durante 67 min. La identificación y cuantificación se realizó por comparación con estándares de CAT, EPI, PCN B<sub>2</sub> y PCN C<sub>1</sub> y los resultados se expresaron en  $\text{mg}\cdot\text{g}$  de flavan-3-ols de mucílago y cascarilla, respectivamente [76].

#### **3.6.6. Cuantificación de Metilxantinas.**

La determinación del contenido de Teobromina y Cafeína se realizó por Cromatografía HPLC (Agilent technologies serie 1100/1200; Waldbronn, Alemania), con ayuda de un detector DAD (273 nm). La separación se realizó utilizando una columna Agilent Zorbax

SB C18 (150 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ). Para el análisis, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra en el equipo (autoinyector G1329A) y se fueron eluyendo, a un caudal de 1 mL/min con una fase móvil compuesta por una solución de metanol en agua al 25% (v/v). La temperatura del horno de columna (G1316A) fue de 25° C. El equipo estuvo controlado por el software Chemstation (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania) [76].

La identificación y cuantificación de las metilxantinas se realizó en comparación con sus respectivos estándares. Los resultados se expresaron, gramos de TBR y CAF por 100g (%) de muestras de mucílago y cascarilla de cacao.

### **3.7. Tratamientos de datos.**

El tratamiento estadístico de los datos y el análisis de correlación Canónica, se realizó con ayuda de un software libre. Mediante la prueba de “t” de student se determinó si existe un efecto de la variedad de cacao (CCN-51 y Nacional) en el perfil de polifenoles y flavonoides de los residuos de la industria cacaotera y chocolatera. Mientras que el análisis de correlación canónica se empleó para identificar a los compuestos responsables de la actividad antioxidante en los coproductos de la cadena de beneficio del cacao (cascarilla y mucílago).

#### **3.7.1. Variables.**

**Variable independiente:** Variedad de procedencia del mucílago o cascarilla de cacao

- Cacao Nacional
- Cacao CCN-51

**Variable dependiente:** Perfil fenólico y metilxantinas de cascarilla y mucílago

- Catequina
- Epicatequina
- Procianidinas
- Teobromina
- Cafeína
- Teofilina

### **3.8. Recursos humanos y materiales.**

#### **3.8.1. Recursos humanos.**

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

- Ing. Wilma Llerena Silva. Directora del proyecto de Investigación.
- Dr. Iván Samaniego Maigua. Cotutor del proyecto de Investigación.
- Ing. Jaime Vera Chang MSc. Académico de Apoyo.
- Ing. Christian Vallejo Torres MSc. Académico de Apoyo.
- Ing. Raúl Díaz Ocampo PhD. Académico de Apoyo.

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

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

- Vasos de precipitación de 50, 100, 250, y 1000 mL.
- Tubos de ensayo
- Balones de aforo de 25, 50, 100, 250 y 500 mL
- Probetas de aforo de 10, 250, 500 y 1000 mL
- Tubos de centrifuga de 15 y 20 mL
- Espátula
- Agitadores magnéticos
- Puntas para micropipeta 100-1000  $\mu$ L y 1-10 mL
- Pissetas
- Gradillas
- Frascos de vidrio color ámbar
- Papel filtro
- Soporte universal
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Puntas de micropipeta 20-200  $\mu$ L
- Puntas de micropipeta 100-1000  $\mu$ L
- Puntas de micropipeta de 1-10 mL
- Tubos Eppendorf
- Guantes de nitrilo pack/50
- Mascarillas
- Frascos plásticos de 250 mL, para muestras
- Columna Agilent Zorbax SB C18+
- Balón volumétrico de 100 mL
- Membrana Millipore PVDF de 0,22  $\mu$ m

### **3.8.2.2. Reactivos.**

Los solventes que se empleó para las determinaciones analíticas serán de grado analítico (98%) y grado cromatográfico (99,9%) se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania):

- Agua desionizada
- Estándares de Catequina
- Estándares de Epicatequina
- Estándares de Procianidinas C<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>
- Cafeína
- Teobromina
- Teofilina
- Hexacianoferrato de Potasio trihidratado
- Sulfato de Zinc dihidratado
- Fase móvil

### **3.8.2.3. Equipos.**

- Congelador
- Balanza analítica
- Baño ultrasónico
- Baño María
- Centrífuga
- Vortex
- Rotoevaporador
- Multimixer
- Reflectómetro
- Placa agitadora
- Cronómetro
- Micropipeta Finnpipette 20-200 µL
- Micropipeta Finnpipette 100-1000 µL
- Micropipeta Labnet de 1-10 mL
- Micropipeta Finnpipette de 1-10 mL
- Micropipetas 100-1000 µL y 1-10 mL
- HPLC Agilent 1100/1200 Series
- Bomba binaria (G1312A)
- Horno de columna (G1316A)
- Detector de arreglo de Diodos (DAD G1315D)
- Auto-inyector (G1329A)

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados

### 4.1.1. Validación de los métodos

La validación de las metodologías de extracción de los compuestos antioxidantes (cascarilla de cacao); así como la identificación, y cuantificación del perfil de compuestos fenólicos y metilxantinas en los residuos de la cadena de beneficio del cacao se realizó empleando métodos previamente validados citados en el manual de métodos para análisis de cacao del INIAP [75]; como se detalla a continuación:

### 4.1.2. Adaptación de las condiciones del método

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detector de arreglo de diodos DAD. Las condiciones cromatográficas empleadas para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en residuos de la cadena de beneficio del cacao se basó en el método desarrollado por Yépez (2017) [60]. Este autor estableció el tipo de columna, la temperatura de horno, el flujo y gradiente de elución de las fases móviles, la longitud de onda y el tipo de detector y el tipo de fases móviles para la determinación de compuestos fenólicos en almendras de cacao. Como se detalla en la Tabla 10.

**Tabla 10.** *Condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por cromatografía HPLC*

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

**FUENTE:** YEPEZ-RIVADENEIRA, JOSÉ (2017) [60].

### 4.1.3. Linealidad

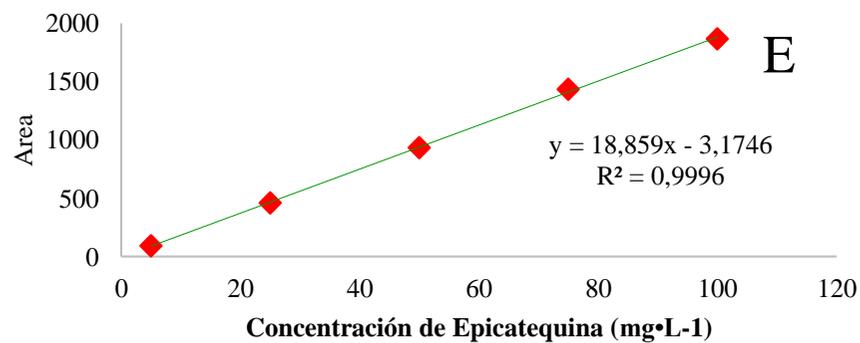
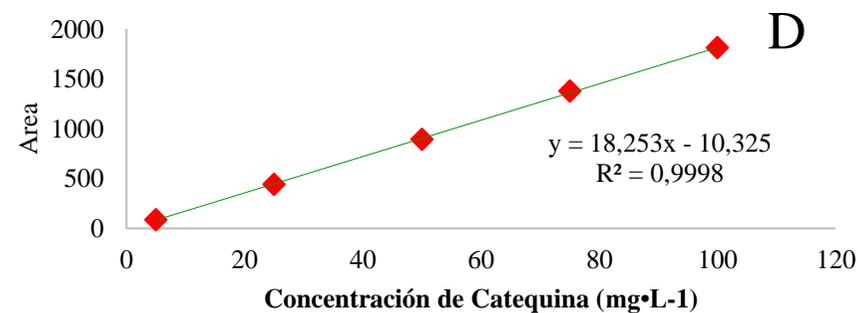
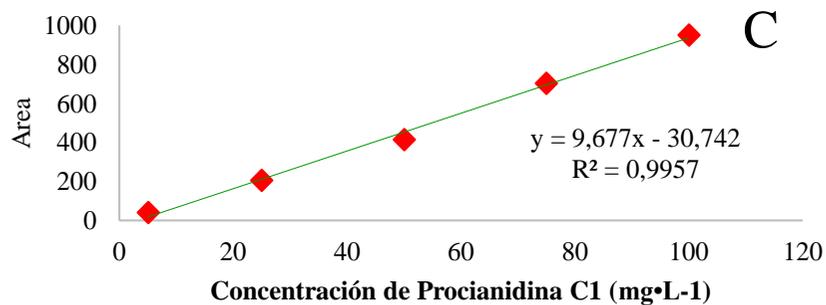
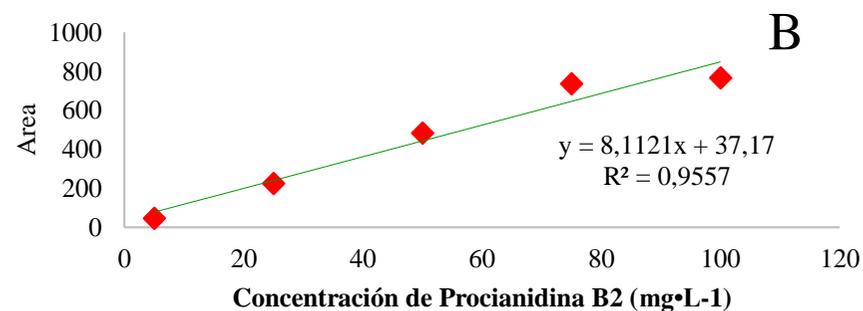
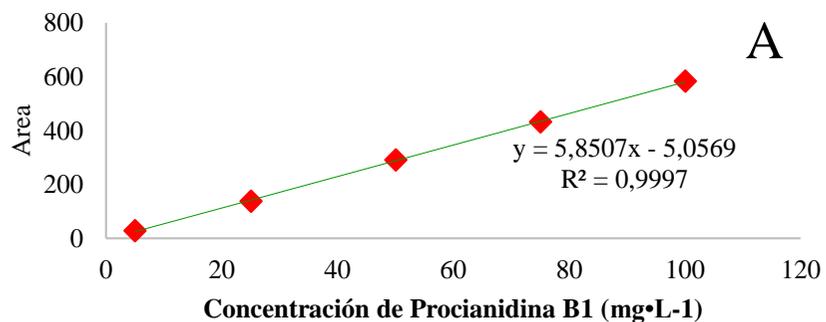
Dentro de la validación del método se realizó el estudio de linealidad de las curvas patrón de Procianidina B<sub>1</sub> (PCN B<sub>1</sub>), Procianidina B<sub>2</sub> (PCN B<sub>2</sub>), Procianidina C<sub>1</sub> (PCN C<sub>1</sub>), Catequina (CAT), Epicatequina (EPI), para esto se emplearon las medias de las áreas de las curvas elaboradas en tres días diferentes. El análisis estadístico de la linealidad se presenta en la Tabla 11:

**Tabla 11.** Evaluación de regresión lineal de las curvas de calibración de flavan-3-ols para la validación de métodos de cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC.

Parámetro	Procianidinas			Catequina	Epicatequina
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>		
<b>Pendiente (m)</b>	5,8507	8,1121	9,6770	18,2531	18,8591
<b>Ordenada origen (Lo)</b>	-5,0569	37,1701	-30,7416	-10,3246	-3,1746
<b>Error típico (Sy,x)</b>	4,2846	78,2408	28,7781	14,2222	18,4953
<b>Desv. Estd. pendiente</b>	0,0564	1,0300	0,3789	0,1872	0,2435
<b>Desv. Estd. ordenada</b>	3,4564	63,1176	23,2156	11,4732	14,9203
<b>t student</b>	3,1824	3,1824	3,1824	3,1824	3,1824
<b>m (mínimo)</b>	5,6712	4,8341	8,4713	17,6573	18,0842
<b>m(máximo)</b>	6,0302	11,3900	10,8827	18,8490	19,6339
<b>Lo (mínimo)</b>	-16,0567	-163,6983	-104,6239	-46,8375	-50,6577
<b>Lo (máximo)</b>	5,9429	238,0385	43,1408	26,1883	44,3084

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 11, las curvas patrón de Procianidina B<sub>1</sub>, Procianidina B<sub>2</sub>, Procianidina C<sub>1</sub>, Catequina, Epicatequina presentaron coeficientes de correlación (R<sup>2</sup>) entre 0,9557 y 0,9998; lo que indica que existe una alta correlación lineal entre la concentración de los componentes fenólicos (X) y el área (Y). Por lo tanto, el 99 % de la variabilidad de los datos experimentales pudieron ser explicados por los modelos de regresión obtenidos, para PCN B<sub>1</sub>, PCN C<sub>1</sub>, CAT, EPI mostrando un ajuste lineal adecuado (R<sup>2</sup> ≥ 0, 99) en todos los casos, excepto PCN B<sub>2</sub> que obtuvo un menor ajuste de 0,9557; sin dejarse de considerar una correlación positiva altamente fuerte.

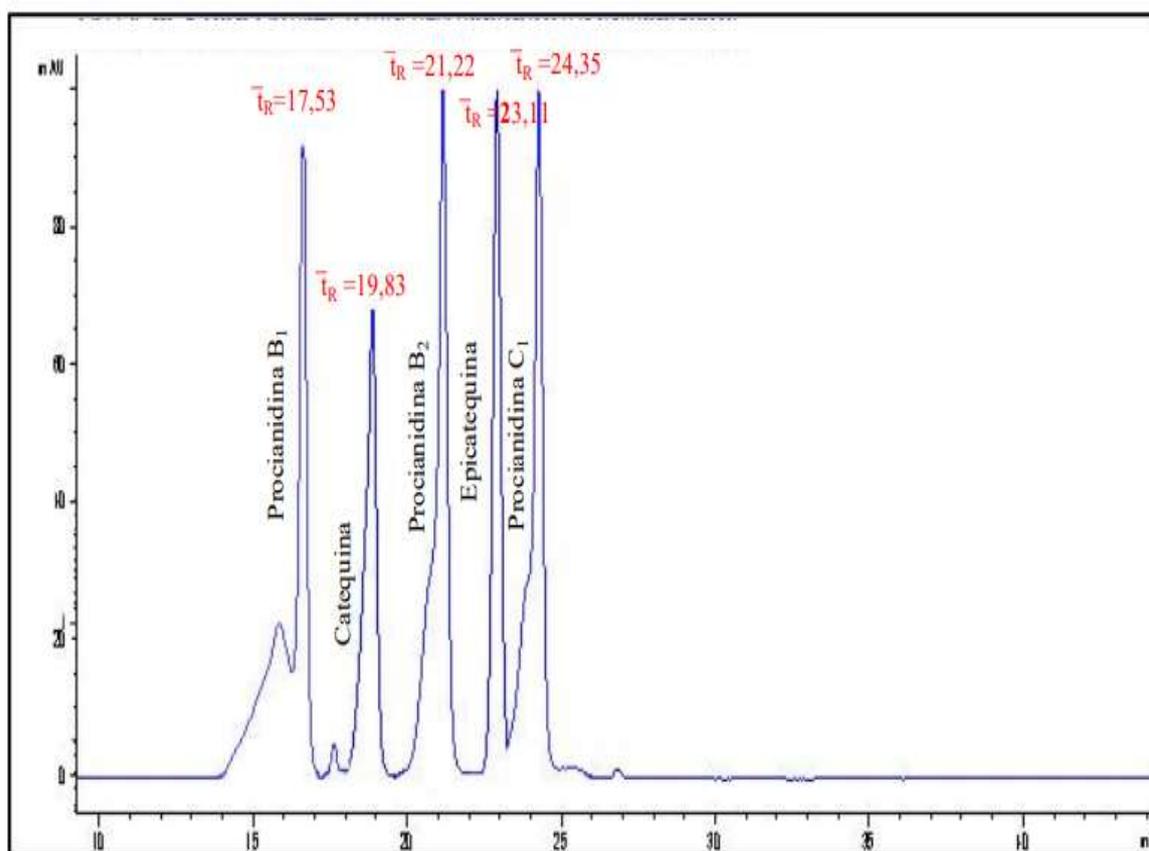
En la Figura 9, se presenta las curvas de calibración promedio empleadas para la cuantificación de compuestos fenólicos de las muestras en estudio:



**Figura 9.** Curvas 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)

#### 4.1.4. Tiempos de retención

Para la identificación de los componentes fenólicos en los diferentes cromatogramas se inyectó estándares puros de CAT, EPI, PCN B<sub>1</sub>, PCN B<sub>2</sub> y PCN C<sub>1</sub>, a partir de esto se estableció el tiempo de retención de cada pico cromatográfico; como se muestra en la Figura 10.



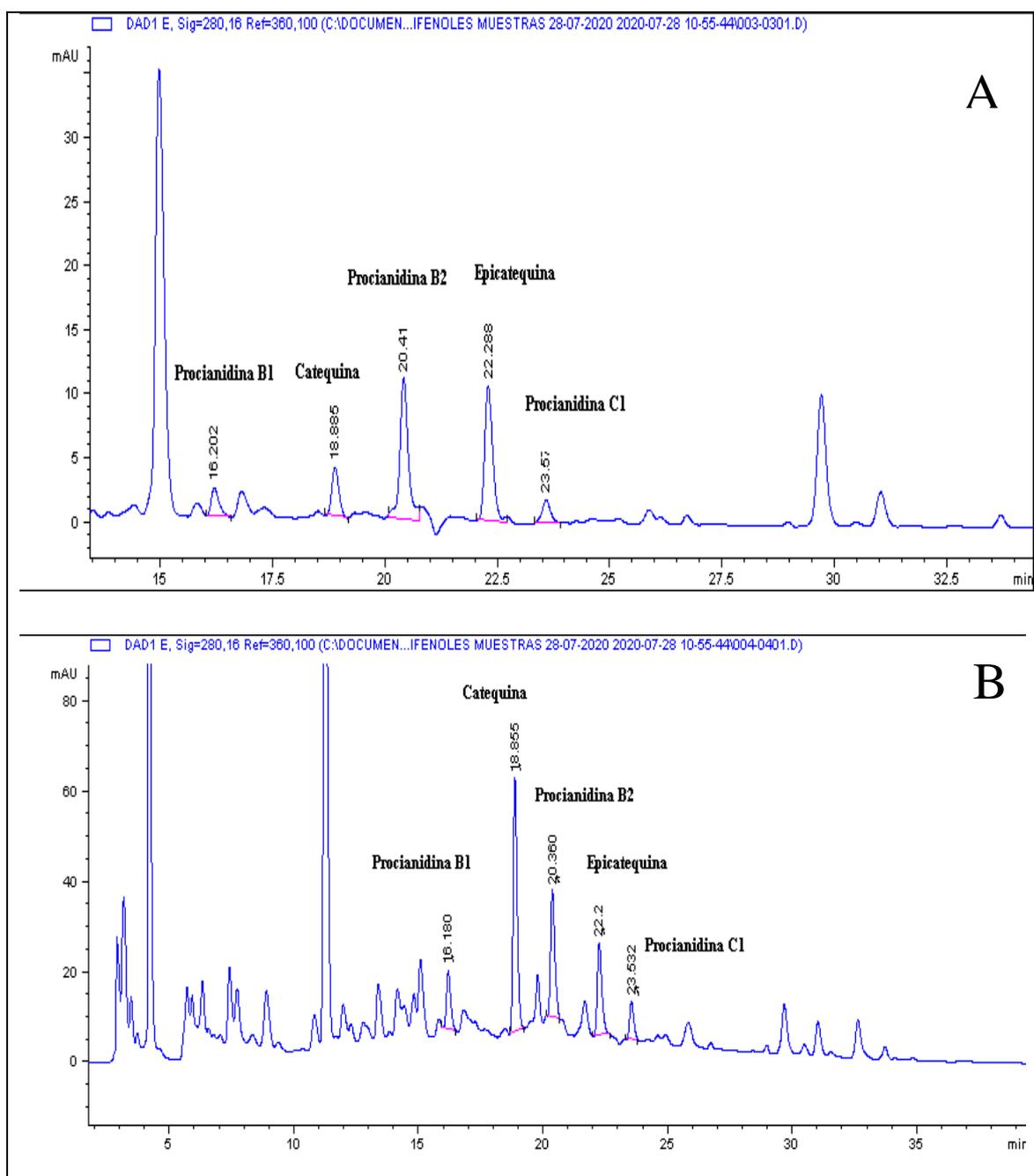
**Figura 10.** Cromatograma de las mezclas de los estándares puros de polifenoles flavan-3-ol

De acuerdo al tiempo de retención los primeros componentes en salir son: PCN B<sub>1</sub> con un tiempo de retención de 17,53 min; seguido por CAT (19,83 min), PCN B<sub>2</sub> (21,22 min), EPI (23,11 min) y PCN C<sub>1</sub> (24,35 min).

## 4.1.5. Identificación y cuantificación del perfil fenólico

### 4.1.5.1. Mucílago de cacao

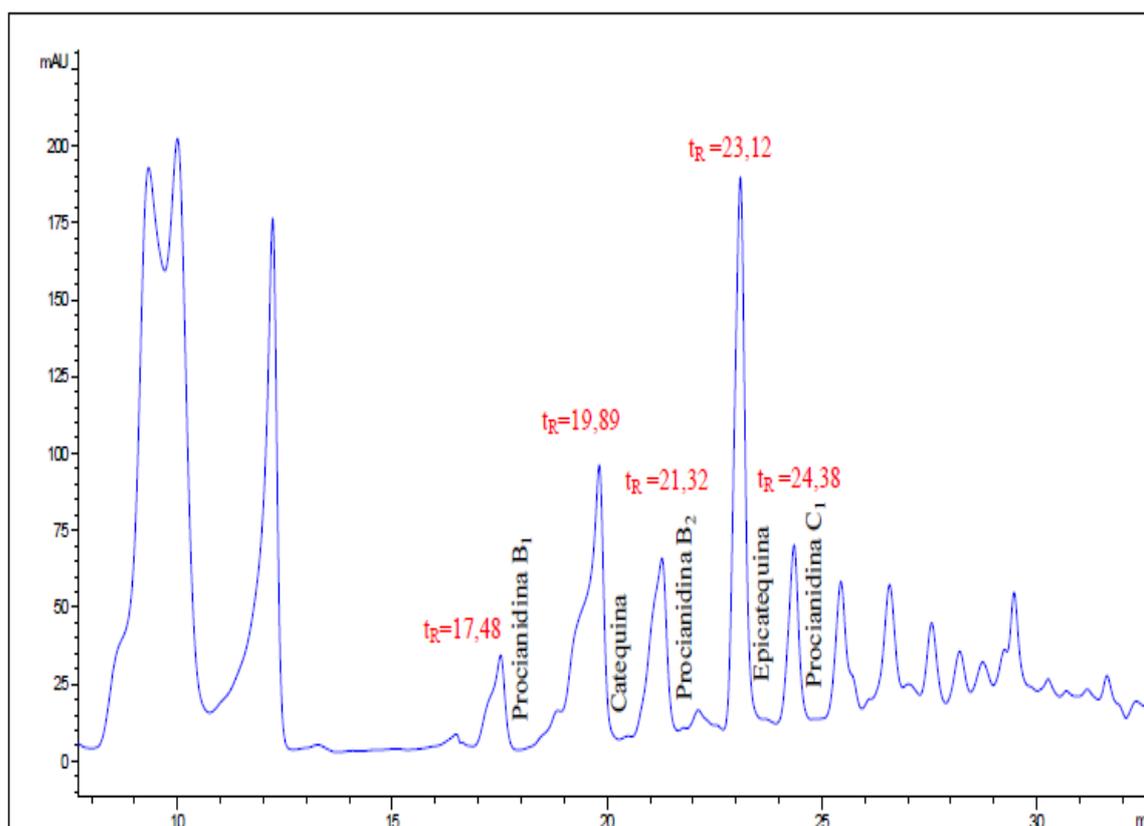
En la Figura 11, se presenta el perfil de compuestos fenólicos o 3-flavan-ols (PCN B<sub>1</sub>, CAT, PCN B<sub>2</sub>, EPI, PCN C<sub>1</sub>) presentes en las muestras de mucílago de cacao Nacional y CCN-51.



**Figura 11.** Identificación del perfil fenólico del mucílago de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B).

Mediante la comparación de los tiempos de retención de los cromatogramas de las muestras con sus respectivos estándares, se identificó que el mucílago de cacao CCN-51 presenta picos cromatográficos a los 16,20 min que corresponden a PCN B<sub>1</sub>, seguido de CAT (18,88 min), PCN B<sub>2</sub> (20,41 min); EPI (22,88 min) y PCN C<sub>1</sub> (23,57 min). Mientras que, en el cromatograma de mucílago de cacao Nacional se identificó presencia de PCN B<sub>1</sub> a los 16,18 min, seguido de CAT (18,88 min), PCN B<sub>2</sub> (20,36 min); EPI (22,2 min) y PCN C<sub>1</sub> (23,53 min).

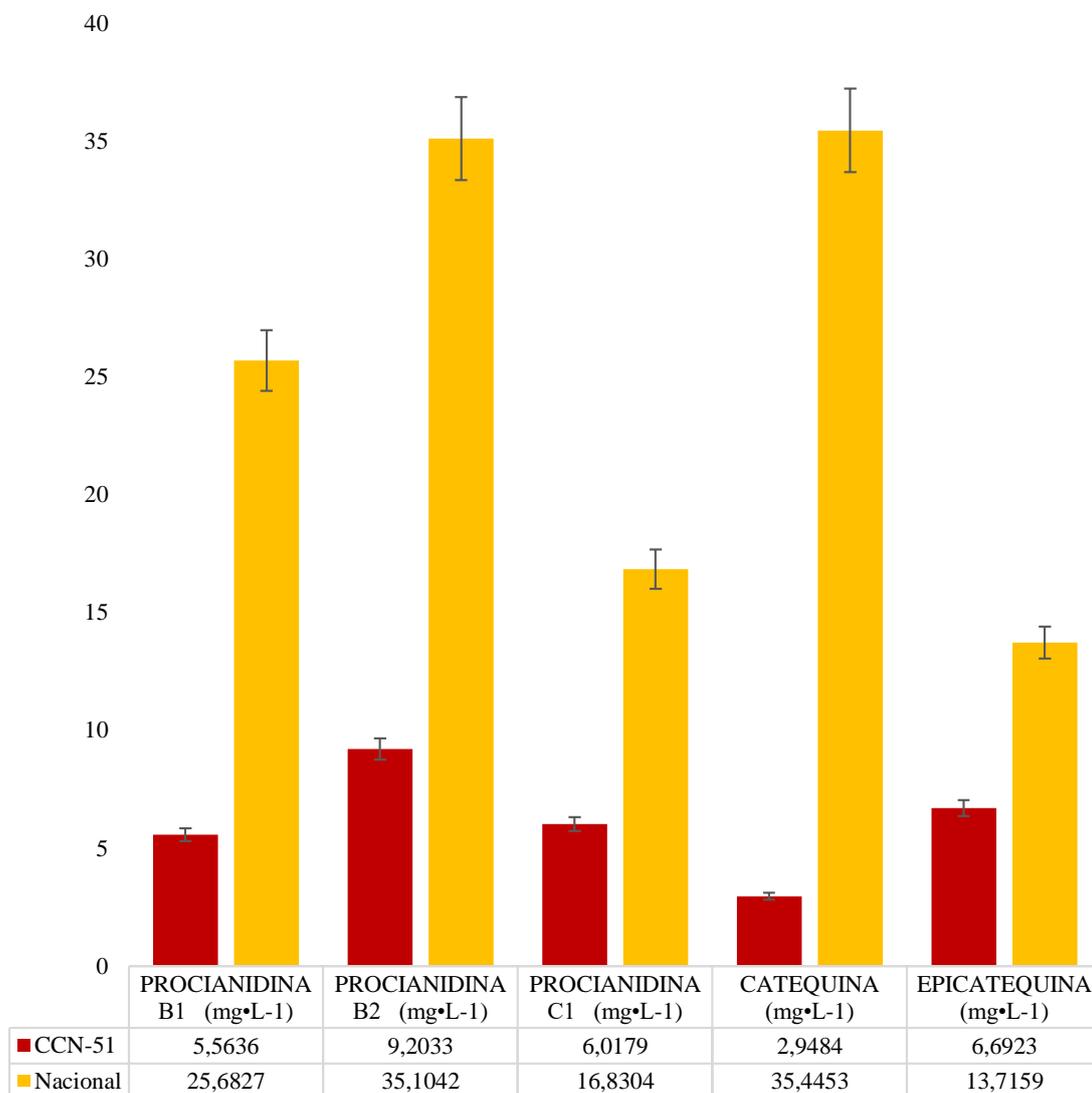
Al comparar los resultados obtenidos con el trabajo realizado por Yépez (2017) [60] se puede observar que las muestras de mucílago presentan el mismo perfil fenólico que las almendras de cacao estudiadas por este autor; sin embargo, los tiempos de retención se ven ligeramente desplazados (Figura 12), sin cambiar su orden de elución. Este autor reporto tiempos de retención de 17,48 min para PCN B<sub>1</sub>, 19,89 min para CAT, 21,32 min para PCN B<sub>2</sub>, 23,12 min para EPI y 24,38 min para PCN C<sub>1</sub> como se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Cromatograma típico de una muestra de cacao CCN-51

**FUENTE:** YEPEZ-RIVADENEIRA, JOSÉ (2017) [60].

Dentro de la cuantificación del perfil de compuestos fenólicos se observó que el mucílago de cacao Nacional, presenta mayor contenido de compuestos fenólicos con relación al mucílago de cacao CCN-51; como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** *Compuestos fenólicos del mucílago de cacao.*

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 13, el componente fenólico mayoritario del mucílago de cacao es la PCN B<sub>2</sub>. A pesar de que la CAT y EPI también son componentes predominantes de las muestras de exudado de cacao estas están directamente asociadas a la variedad de procedencia del mucílago; puesto que, la concentración de CAT es similar a la PCN B<sub>2</sub> en cacao Nacional y la EPI es el componente mayoritario en cacao CCN-51.

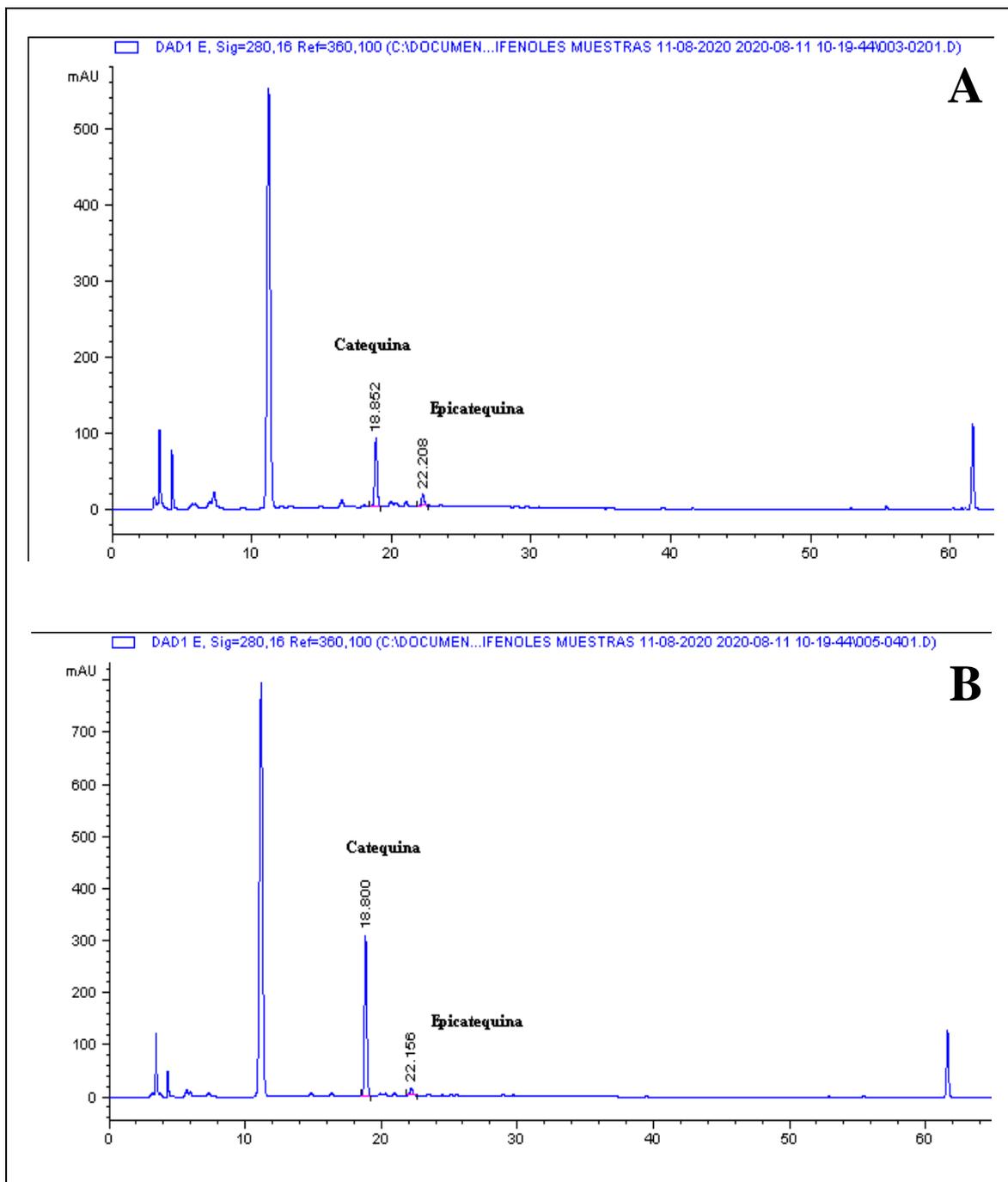
Por orden de concentración, en mucílago de cacao Nacional el perfil fenólico está compuesto por CAT ( $35,44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PCN B<sub>2</sub> ( $35,10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PCN B<sub>1</sub> ( $25,68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PCN C<sub>1</sub> ( $16,83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) y EPI ( $13,71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Mientras que, en mucílago de cacao CCN-51 el perfil fenólico lo compone la PCN B<sub>2</sub> ( $9,20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), EPI ( $6,69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PCN C<sub>1</sub> ( $6,01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), PCN B<sub>1</sub> ( $5,56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) y CAT ( $2,94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

En función de los resultados obtenidos se estableció que las dos variedades de cacao presentaron el mismo perfil fenólico, sin embargo; este varía en el contenido de cada compuesto fenólico, determinándose que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la concentración de dichos componentes. Por lo tanto, a nivel estadístico se rechaza la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) evidenciándose que existe un efecto de la variedad sobre los contenidos de PCN B<sub>1</sub> ( $p = 0,000000178886$ ), CAT ( $p = 0,0000000118194$ ), PCN B<sub>2</sub> ( $p = 0,00000364441$ ), EPI ( $p = 0,000000435935$ ) y PCN C<sub>1</sub> ( $p = 0,00135269$ ).

Estudios realizados por diferentes autores en subproductos del cacao, reportaron que el mucilago contiene compuestos fenólicos tipo flavan-3-ols, monómeros de catequina y epicatequina y el dímero Procianidina B<sub>2</sub> [47], [77], [78]; confirmando los resultados obtenidos en este trabajo de investigación. Al comparar los resultados obtenidos de uno de los residuos mayoritarios de la cadena de beneficio del cacao (mucílago) con las almendras, se identificó que los principales grupos de compuestos fenólicos identificados son: Proantocianidinas (58%), flavan-3-ols monómeros (+) catequina, CAT y (-) epicatequina, EPI, (37%) y antocianinas (4%). La concentración de dichos componentes es menor que en las almendras de cacao donde se reportan concentraciones entre 4,73 y 6,03 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) para CAT, 4,96 y 7,78 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) para EPI, 2,13 y 2,91 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) PCN; para muestras procedentes de la provincia de Los Ríos [76].

#### **4.1.2. Cascarilla de cacao**

El análisis de perfil fenólico en la cascarilla de cacao Nacional y CCN-51, permitió identificar presencia de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina, observándose mayor contenido de (+)-Catequina con relación a la (-)-epicatequina en las dos variedades (Figura 14)

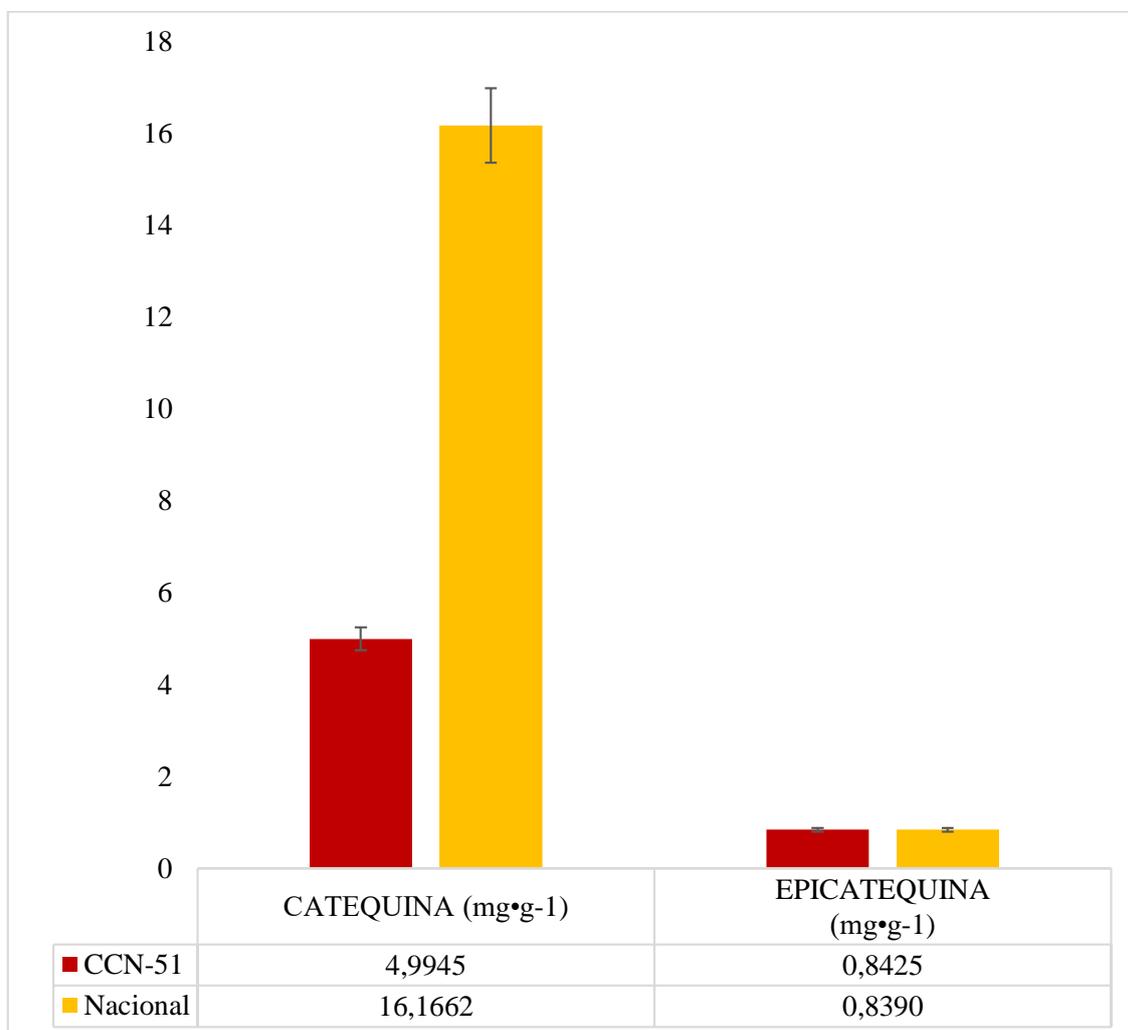


**Figura 14.** Identificación del perfil fenólico de la cascarilla de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B).

En la Figura 14, se logran visualizar que los picos más altos corresponden al contenido de (+)-Catequina en las dos muestras de cascarilla de cacao. En muestras de la variedad Nacional, se registraron tiempos de retención de 18,80 min en (+)-Catequina y 22,15 min para (-)-Epicatequina. En el caso de la variedad CCN-51 se registraron tiempos de 18,85 min para (+)-Catequina y 22,20 min para (-)-Epicatequina.

#### 4.1.2.1. Cuantificación de compuestos fenólicos en cascarilla de cacao

Dentro de la cuantificación del perfil de compuestos fenólicos se observó que las muestras de cascarilla de cacao solo presentan Catequina (CAT) y Epicatequina (EPI) en las dos variedades de cacao; tal como se muestra en la Figura 15.



**Figura 15.** *Compuestos fenólicos de la cascarilla de cacao.*

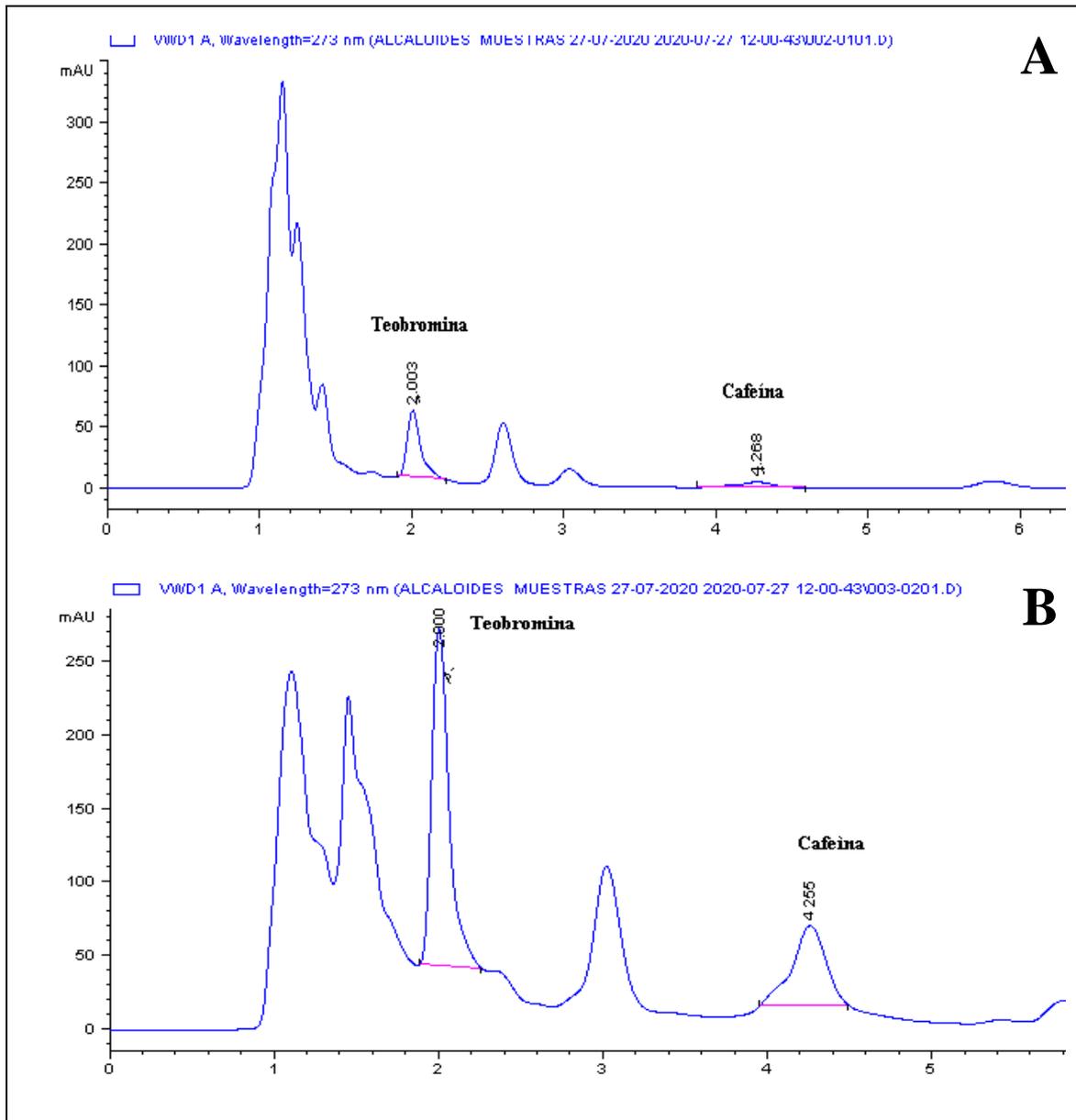
Al comparar los compuestos fenólicos se logra observar que existe una amplia prioridad en cuanto al contenido de Catequina en las dos muestras de cascarilla de cacao.

Como se logra observar en la Figura 15 el cacao Nacional cuenta con 16,26 (mg•g-1) de CAT y 0,83 (mg•g-1) de EPI. En cuanto al cacao CCN-51 se obtuvieron resultados de 4,99 (mg•g-1) de CAT y 0,84 (mg•g-1) de EPI.

### 4.1.3. Identificación del perfil de alcaloides.

#### 4.1.3.1. Mucílago de cacao.

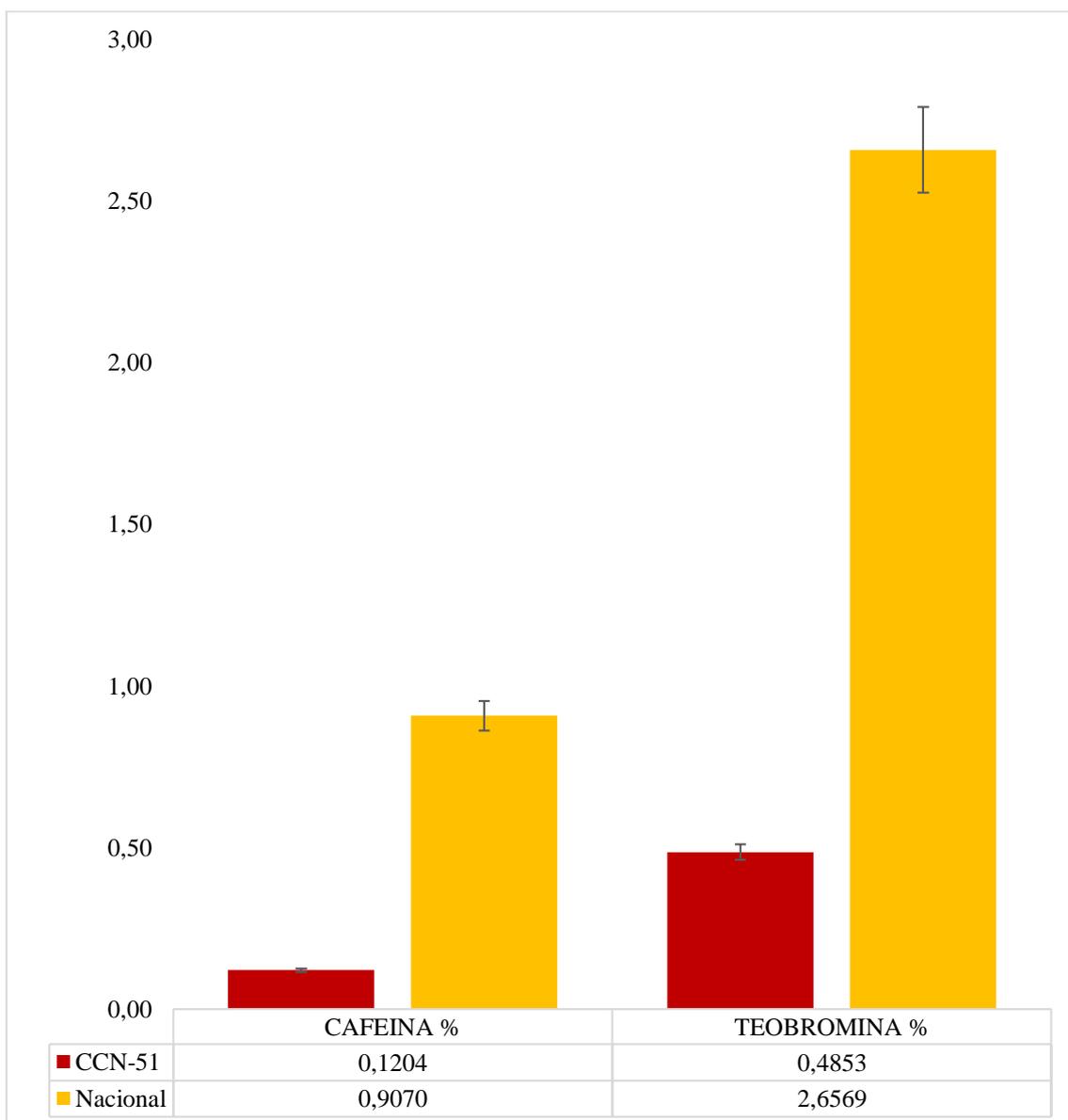
De igual manera, se realizó la identificación y cuantificación de alcaloides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), este estudio permitió identificar que las metilxantinas que predominan en las dos variedades de mucílago de cacao son la Teobromina y Cafeína (Figura 16).



**Figura 16.** Identificación del perfil de metilxantinas del mucílago de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B).

Los resultados presentados en la Figura 16, permitieron establecer que, el mucílago de cacao de la variedad Nacional, presenta picos de metilxantinas correspondientes a Teobromina y Cafeína que eluyeron en un tiempo de 2,00 y 4,25 min; respectivamente. Estos picos son más altos que los obtenidos en mucilago de cacao CCN-51, los mismos que, se registraron en tiempos de retención de 2,003 min en Teobromina y 4,26 min en Cafeína.

Los resultados obtenidos del análisis de alcaloides en mucilago de las variedades Nacional y CCN-51 se presentan en la Figura 17.



**Figura 17.** *Metilxantinas del mucílago del cacao.*

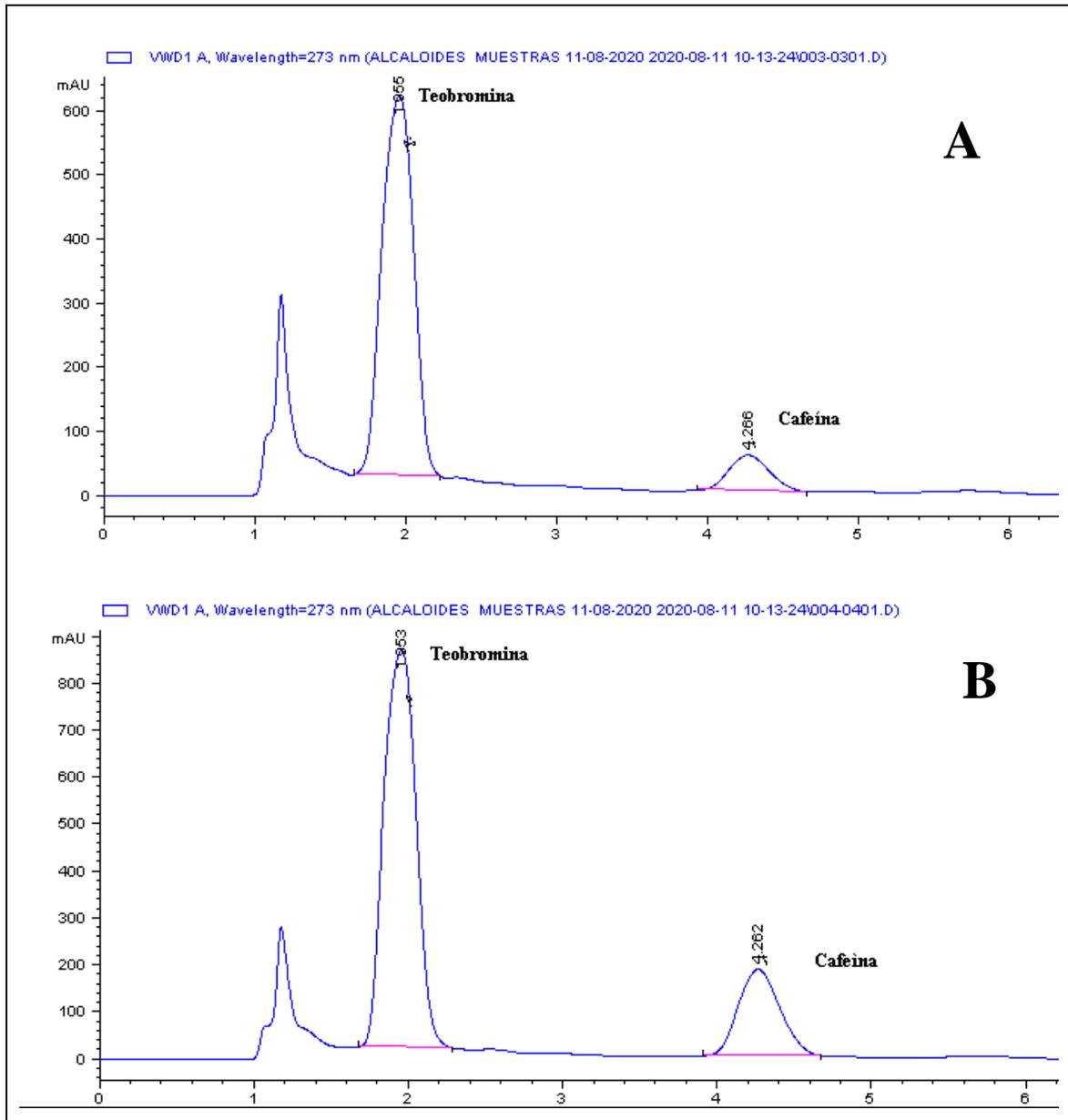
La Teobromina (TBR) es el alcaloide que se encuentran en mayor concentración en el mucílago de cacao. En las muestras de la variedad Nacional la concentración de TBR fue superior (2,65 %) que en las muestras de CCN-51 (0,48%). La concentración de Cafeína siguió el mismo comportamiento que la TBR, presentando una concentración de 0,90% en la variedad Nacional y 0,12% en CCN-51.

El análisis estadístico de los resultados, permitió establecer que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la concentración de alcaloides de mucílago de las dos variedades de cacao, por lo que, se determinó que existe un efecto de la variedad sobre los contenidos de CAF ( $p = 0,00000490298$ ) y TBR ( $p = 0,00000196066$ ) de las muestras estudiadas.

Estudios previos realizado por Okiyama y colaboradores (2016) [67] demostraron que las metilxantinas son conocidas por sus efectos psicoactivos, de ahí el interés en su determinación en muestras de cacao. Tanto las almendras y sus co-productos son ricos en metilxantinas, Cafeína (1,3,7-trimetilxantina), Teobromina (3,7-dimetilxantina) y Teofilina. Sin embargo, este último compuesto se detecta en el chocolate a niveles tan bajos que su presencia suele ignorarse.

#### 4.1.3.2. Cascarilla de cacao.

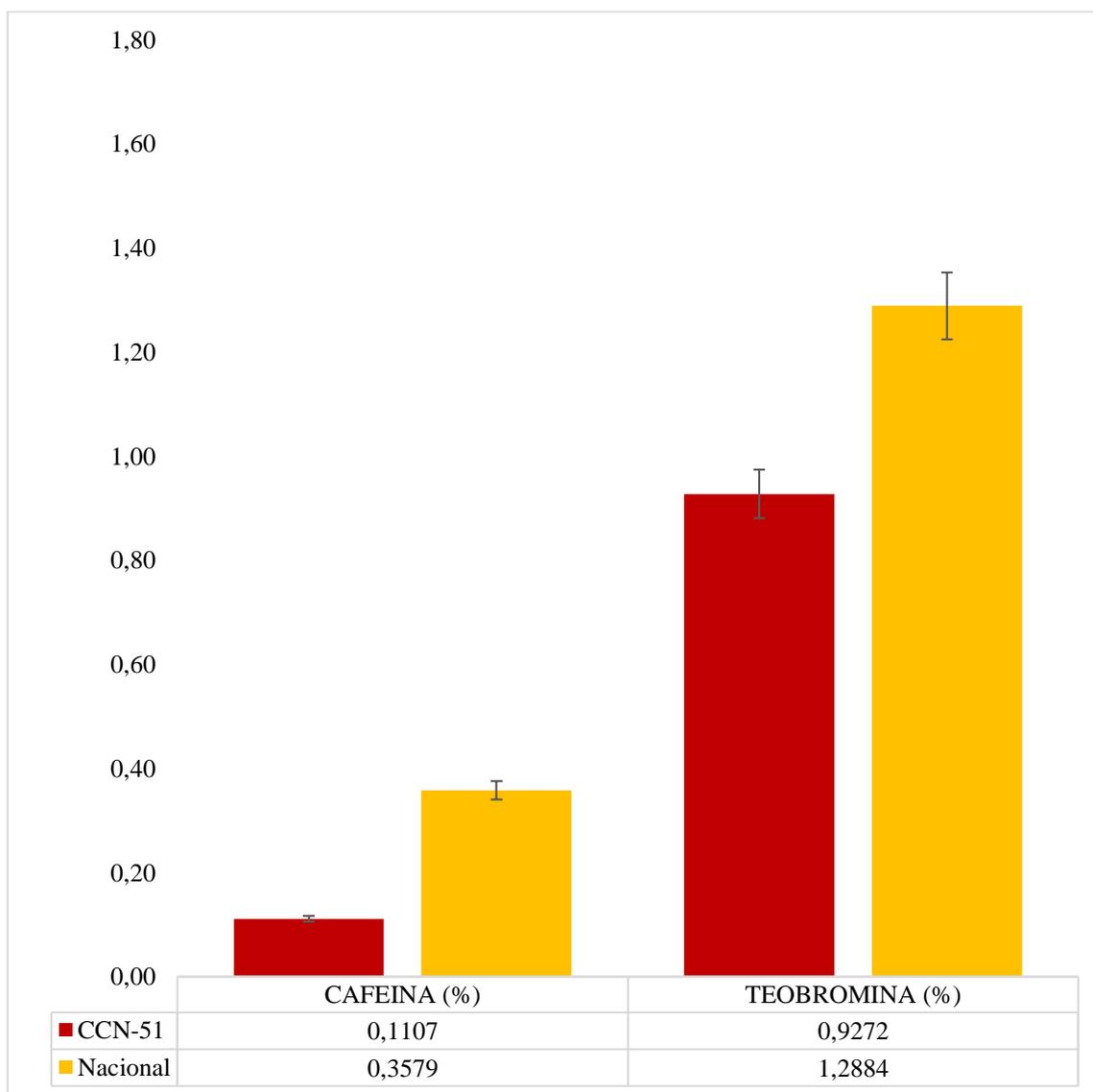
Mediante el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se identificó el perfil de metilxantinas en la cascarilla de las dos variedades de cacao, determinándose que este subproducto de la cadena de producción el cacao presenta contenidos de Teobromina y Cafeína, como se muestra en la Figura 18.



**Figura 18.** Identificación del perfil de metilxantinas de la cascarilla de cacao: CCN-51 (A) y Nacional (B).

Al igual que en el mucilago de cacao, el alcaloide mayoritario en las dos variedades de cascarilla de cacao es la Teobromina (Figura 18), seguido por el contenido de Cafeína. En las muestras de las dos variedades de cacao, los tiempos de retención registrados para Teobromina y cafeína fueron 1,95 y 4,26 min.

Una vez identificadas las metilxantinas presentes en la cascarilla de cacao, se procedió a cuantificar el contenido de Teobromina y Cafeína en las dos variedades de cacao, como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Metilxantinas de la cascarilla de cacao

De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 19) se estableciéndose que el alcaloide mayoritario de las dos variedades de cascarilla de cacao es la Teobromina (0,92 a 1,28 %). La variedad Nacional presentó los mayores contenidos de Cafeína (0,35%) y de Teobromina (1,28%), en relación al contenido de metilxantinas de la cascarilla de la variedad CCN-51 (CAF= 0,11% y TBR= 0,92%). El análisis estadístico de los resultados, demostrándose que existe un efecto de la variedad de cacao sobre el contenido de Teobromina y Cafeína de las cascarillas de cacao ( $p < 0,05$ )

Según estudios realizados por Gomes y colaboradores (2020) [79] las variaciones en los contenidos de metilxantinas del cacao y sus co-productos dependen de varios parámetros experimentales de fermentación, tales como: la pérdida de humedad de la semilla, la ruptura de las células cotiledóneas después de la muerte del embrión y la lixiviación de las células compuestas entre los días 2 y 3 de la fermentación.

De acuerdo al trabajo de investigación realizado por Martínez y colaboradores (2012) [77], la actividad antioxidante de los subproductos del cacao (cáscara de vaina, almendra y mucílago) podrían atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos como Catequina, Epicatequina y Procianidina B<sub>2</sub>. Por lo que, en este estudio se relacionó los resultados del perfil fenólico y de metilxantinas con la capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC, mediante un análisis de correlación de Pearson ( $r$ ).

El análisis de correlación de Pearson, para las muestras de mucílago de cacao, se presenta en la Tabla 13.

**Tabla 12.** Coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas del mucílago de cacao.

PERFIL DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE		
	ABTS (%)	FRAP (%)	ORAC (%)
Procianidina B <sub>1</sub>	99,93	99,99	95,01
Procianidina B <sub>2</sub>	99,82	99,67	94,89
Procianidina C <sub>1</sub>	96,97	97,02	92,20
Epicatequina	99,85	99,81	94,49
Catequina	99,95	99,91	94,93
Cafeína	99,79	99,94	94,74
Teobromina	99,87	99,73	94,98

*Elaborado por: ZHUNIO-BILLY (2020).*

Como se muestra en la Tabla 13, la actividad antioxidante del mucílago de cacao medida por el método de ABTS mostró una correlación positiva fuerte ( $r= 0,96 - 1,00$  o 96 -100 %) con el contenido de compuestos fenólicos como las Procianidinas B<sub>1</sub> (99,93 %), B<sub>2</sub> (99,82 %) y C<sub>1</sub> (99,97 %), Epicatequina (99,85 %), Catequina (99,95 %).

La capacidad antioxidante del mucílago de cacao medido por el método de FRAP presenta una correlación positivamente fuerte con los compuestos bioactivos y metilxantinas (99%) ya mencionados anteriormente; sin embargo, con la Procianidina C<sub>1</sub> el valor de correlación fue inferior a los obtenidos para el resto de 3.-flavan-ols y metilxantinas. A pesar de que se obtuvo una correlación de 97,02 %, el grado de relación sigue siendo positivo fuerte, por lo que no deja de ser importante, manteniéndose dentro del rango estipulado en los resultados del coeficiente de correlación.

En el método ORAC los porcentajes de la correlación de Pearson fueron inferiores a los obtenidos por los métodos de ABTS y FRAP; presentando una correlación positiva fuerte ( $r= 0,95 - 1,00$  o 95 - 100%) para Procianidina B<sub>1</sub> (95,01 %). Para compuestos como la

Procianidina B<sub>2</sub>, CAT; EPI; PCN-C<sub>1</sub> se evidenció una correlación positiva moderada ( $r=0,50 - 0,94$  o  $50 - 94 \%$ ); con valores de 94,89; 94,93; 94,49 y 92,20 %.

Los resultados obtenidos en este estudio, concuerdan con el trabajo reportado por Campos Vega y colaboradores (2018) [78], quien mencionó que las Procianidinas B<sub>1</sub> y B<sub>3</sub> y (+) – catequina son compuestos fenólicos que están relacionados con la actividad antioxidante cuyo objetivo es atrapar radicales peróxido, previenen la peroxidación de los lípidos, un tipo de daño celular inducido por ROS y lipoproteínas de baja densidad [77].

A pesar de que la Teobromina y Cafeína son alcaloides de origen natural con efecto estimulante, se ha demostrado que estas protegen eficazmente del estrés oxidativo. Por lo que se puede determinar que los altos niveles de correlación entre los contenidos de Cafeína y Teobromina con los tres métodos de actividad antioxidante in vitro, utilizados en el estudio: ABTS (>99,00 %), FRAP (>99,00 %) y ORAC (>94,00 %), se debe a que las metilxantinas presentan beneficios cardiovasculares como la reducción de la presión arterial, efectos antiinflamatorios y los niveles de colesterol HDL en sangre [80].

De igual manera, que, en las muestras de mucilago de cacao, se realizó el análisis de correlación Pearson entre el contenido fenólico y de metilxantinas para las muestras de cascarilla de cacao de la variedad Nacional y CCN 51, como se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 13.** Coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre la actividad antioxidante y los compuestos de perfil fenólico y metilxantinas de la cascarilla de cacao.

PERFIL DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE		
	ABTS (%)	FRAP (%)	ORAC (%)
Epicatequina	17,26	28,63	-05,19
Catequina	-96,93	-98,58	-87,24
Cafeína	-97,29	-98,45	-87,22
Teobromina	-98,31	-97,61	-86,94

*Elaborado por: CORONEL-ZOMAYRA (2020).*

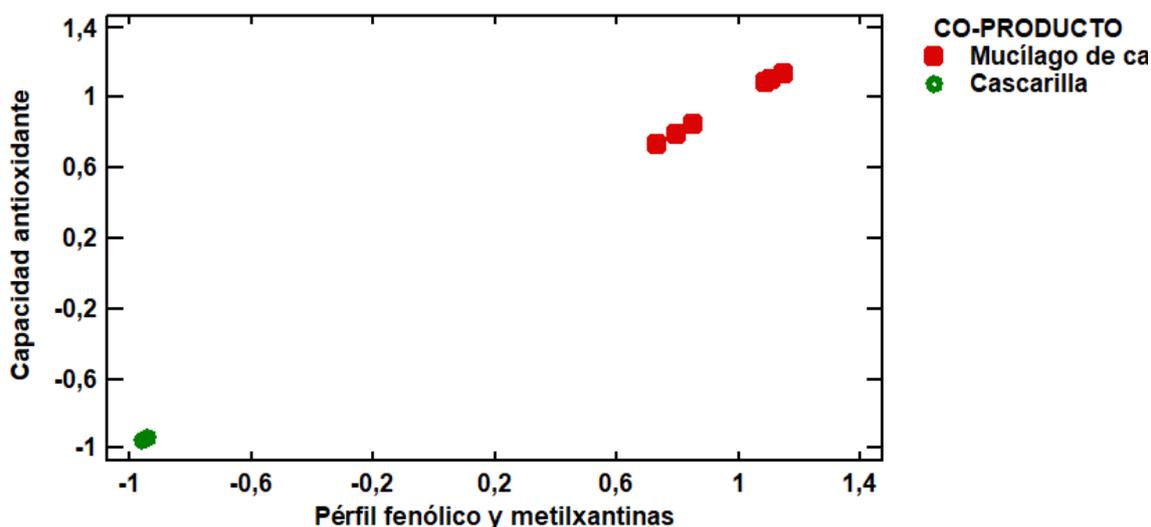
De acuerdo a los resultados reportados en la Tabla 14 la capacidad antioxidante medida por ABTS y FRAP presenta una correlación positiva débil ( $r=0,10 - 0,49$  o 10- 49%) con el contenido de Epicatequina de la cascarilla de cacao con valores de 17,26; 28,63% respectivamente. Mientras que, al relacionar la Epicatequina con la capacidad antioxidante medida por ORAC, este presentó una correlación negativa débil ( $r= -5,19\%$ ).

En el caso de contenido de Catequina, Cafeína y Teobromina se observó que existe una correlación negativa fuerte ( $r=-0,95: -0,99$  o  $-95: -99\%$ ) con la capacidad antioxidante medidas por los métodos de ABTS ( $-96,93; -97,29; -98,31\%$ ) y FRAP ( $-98,58; -98,45; -97,61\%$ ). Mientras que, la correlación de estos componentes con la capacidad antioxidante medida por ORAC ( $-87,24; -87,22; -86,94\%$ ) fue negativa moderada ( $r=-0,50: -0,94$  o  $-50: -94\%$ ). Por lo que a medida que una de estas variables aumenta, la otra variable disminuye.

Con base a estos resultados obtenidos, se puede establecer que la capacidad antioxidante medida en las muestras, no viene dada directamente por los compuestos fenólicos y metilxantinas presentes en la cascarilla de cacao. De tal manera que, la capacidad antioxidante de este residuo de la industria chocolatera puede depender o estar asociado a otros compuestos presentes en mayor concentración que los 3 flavan-ols y metilxantinas.

### **Correlación de canónica**

Al realizar el análisis de correlación de Pearson ( $r$ ) se observó que en el mucilago de cacao existe una correlación positiva fuerte y perfecta, entre los fitonutrientes evaluados y la capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC. Mientras que, en la cascarilla de cacao, no existe una correlación significativa de los componentes fenólicos y metilxantinas con la capacidad antioxidantes o la correlación es negativamente perfecta con los métodos empleados. Por lo tanto, se consideró necesario evaluar el efecto del contenido fenólico y los alcaloides de los dos residuos de la cadena de beneficio del cacao sobre la capacidad antioxidante, de manera simultánea. Para esto se empleó un análisis de correlación canónica (**Figura 16**) cuyo objetivo es buscar las relaciones entre dos grupos de variables; el primer grupo de variables consideradas son los antioxidantes de las muestras y segundo el grupo formado por los resultados de capacidad antioxidante.



**Figura 20.** Análisis de correlación canónica entre la capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC y el contenido fenólico y metilxantinas de mucílago y cascarilla de cacao.

De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 16, existe una alta correlación entre el contenido de antioxidantes (PCN-B<sub>1</sub>, PCN-B<sub>2</sub>, PCN-C<sub>1</sub>, EPI, CAT, TBR y CAF) y la capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC. La primera correlación canónica encontrada es estadísticamente significativa ( $p=0,000$ ), con una magnitud de 0,9999; considerándose particularmente fuerte. Las ecuaciones canónicas (**Ecuación 1 y 2**) asociadas fueron expresadas la siguiente manera:

$$ATX = 2.10PCB_1 - 60.12PCB_2 - 0.0008PCC_1 - 0.53CAT + 12.05EPI - 6.59CAF + 52.53TEO \quad \text{Ecuación 1}$$

$$CA = -0,102 ABTS + 1,21 FRAP - 0,112 ORAC \quad \text{Ecuación 2}$$

**Dónde:** **ATX** corresponde a los antioxidantes evaluados (PCN-B<sub>1</sub>, PCN-B<sub>2</sub>, PCN-C<sub>1</sub>, EPI, CAT, TBR y CAF) y **CA** corresponde a la capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC

Los coeficientes de las ecuaciones canónicas muestran como la variable denominada antioxidantes (ATX) está definida fundamentalmente por el contenido en Teobromina, Epicatequina y Cafeína de los residuos de cacao; mientras que, la variable capacidad antioxidante (CA) viene definida por las determinaciones obtenidas con el método FRAP.

A nivel general, se puede plantear que en base a la capacidad antioxidante de la cascarilla y el mucilago de cacao se pueden diferenciar dos grupos muy marcados. El primer grupo está compuesto por el mucilago de cacao cuya capacidad antioxidante se debe principalmente al contenido de TBR, CAF y EPI; mientras que el segundo grupo lo compone la cascarilla de cacao. Los resultados obtenidos demuestran que el mucilago de cacao es un residuo con una alta actividad antioxidante in vitro, lo que podría determinarse que los fitonutrientes presentes en este coproducto de la cadena de beneficio del cacao son efectivos en la eliminación de radicales, neutralización de la acción nociva de las especies reactivas y transferencia de radicales hidrógenos, presentando valores muy altos de capacidad antioxidante por distintos métodos.

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se puede establecer que los antioxidantes se acumulan en las partes externas de plantas, como mazorcas, pieles, cáscaras, flores; así como en los frutos. Sin embargo, durante la industrialización o proceso de beneficio se generan fuentes de componentes bioactivos infrautilizados como los residuos agroindustriales. En el caso de la cadena de beneficio del cacao el mucilago y la cascarilla podrían representar una fuente de nutracéuticos de bajo costo con una excelente actividad biológica. Cuyo potencial permitiría incursionar a los productores en un proceso de valorización de residuos con un enfoque de economía circular, caminando hacia una política ambiental cero residuos.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones

- A partir de cromatografía líquida de alta de resolución se determinó que las muestras de mucilago y cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional presentan un perfil fenólico y contenido de metilxantinas similar a las almendras de cacao; encontrándose compuestos como Procianidinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>, Epicatequina, Catequina, Cafeína y Teobromina.
- Las muestras de mucilago de cacao presentaron un perfil fenólico rico en Procianidina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>, Epicatequina y Catequina, encontrándose una variación entre las muestras de mucilago Nacional (35,44; 35,10; 25,68; 16,83; 13,71 mg•L<sup>-1</sup>) y CCN-51 (9,20; 6,69; 6,01; 5,56; 2,94 mg•L<sup>-1</sup>). Por el contrario, la cascarilla de cacao presenta únicamente Catequina y Epicatequina; encontrándose un efecto de la variedad en el contenido de CAT; siendo mayor en Nacional (16,16 mg•L<sup>-1</sup>) que en CCN-51 (4,99 mg•L<sup>-1</sup>). La ausencia de Procianidinas en la cascarilla de cacao se debe a que estos compuestos se pierden en estado de fermentación (60%), secado y tostado del grano.
- El perfil de alcaloides de los coproductos del cacao es similar a las almendras de cacao; encontrándose Cafeína y Teobromina en el mucílago y cascarilla de cacao. En mucilago de cacao Nacional el contenido de CAF (0,90%) y TBR (2,65 %) fue superior que en el exudado de la variedad CCN-51 (0,12% CAF; TBR 0,48 %); demostrándose que existe un efecto estadístico de la variedad sobre el contenido de metilxantinas.
- El perfil fenólico y los alcaloides de los residuos del cacao presentaron una variación por efecto de la variedad y el tipo de co-producto del cacao. En mucílago de cacao la variedad Nacional presentó una mayor concentración que las muestras de cacao CCN-51. En estas muestras se identificaron componentes como CAT, PCN B<sub>2</sub>, PCN B<sub>1</sub>, PCN C<sub>1</sub> y EPI. En cuanto a la cascarilla de cacao, se evidenció un efecto de la variedad en el contenido de Catequina y metilxantinas; siendo superior en la variedad Nacional (CAT=16,16 mg•g<sup>-1</sup>; CAF=0,35 y TBR=1,28 %) que en CCN-51 (CAT=4,99 mg•g<sup>-1</sup>; CAF=0,11 y TBR= 0,92 %). Sin embargo, el contenido de

Epicatequina no evidenció un efecto de la variedad sobre la concentración de este componente fenólico; presentando concentraciones de 0,83 y 0,84 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) para cascarilla Nacional y CCN-51; en ese orden.

- De acuerdo a los resultados obtenidos por el análisis de correlación de Pearson se demostró que la actividad antioxidante presenta una correlación positiva fuerte con el contenido de Procianidina ( $B_1$ ,  $B_2$  y  $C_1$ ), Epicatequina, Catequina. Con una correlación positiva moderada (94%) con el contenido de metilxantinas dando en las dos variedades de mucílago de cacao estudiadas.

En cascarilla de cacao se evidenció que la capacidad antioxidante de este residuo, no viene dada directamente por compuestos fenólicos como la EPI (ORAC), Sin embargo, la CAT y las metilxantinas CAF y TBR presentan una correlación negativa fuerte con la capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y ORAC; lo que indica que a medida que uno de estos componentes incrementa; la capacidad antioxidante disminuye.

- A través de análisis de correlación canónica se evaluó la correlación entre los componentes antioxidantes y la capacidad antioxidante; determinándose que la variable denominada antioxidantes (ATX) está definida fundamentalmente por el contenido en Teobromina, Epicatequina y Cafeína de los residuos de cacao; mientras que, la variable capacidad antioxidante (CA) viene definida por las determinaciones obtenidas con el método FRAP. Encontrándose una primera correlación canónica estadísticamente significativa ( $p=0,000$ ), con una magnitud particularmente fuerte (0,9999).
- En base a los resultados se puede concluir que los residuos generados por la cadena de beneficio del cacao se pueden aprovechar para la obtención de una amplia gama de compuestos biológicamente activos, con efecto benéfico para la prevención de enfermedades crónica degenerativas. Estos pueden emplearse como ingredientes funcionales para la industria alimentaria.

## 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda que se estudien a profundidad estos residuos agroindustriales (mucílago, placenta y cascarilla) generados por la cadena de beneficio del cacao; lo que permitiría implementar una política cero residuos en uno de los productos de mayor interés dentro del sector agroindustrial ecuatoriano, generando nuevos ingresos económicos para el país.
- Emplear los residuos de más variedades o clones de cacao de las diferentes regiones del Ecuador, evaluando el efecto del tiempo de fermentación, secado y tostado sobre la concentración de compuestos fenólicos y alcaloides en los residuos de la cadena de beneficio del cacao.
- Emplear los compuesto bioactivos de los residuos del cacao para el desarrollo de alimentos funcionales, empleándolos en diferentes matrices alimentarias, consideradas como alimentos de alto valor calórico o carente de propiedades nutricionales y funcionales.

**CAPITULO VI**  
**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] C. Vallejo, R. Díaz Ocampo, W. Morales, R. Velasco, J. Vera, and C. Baren, “Utilización del mucílago de cacao, tipo Nacional y Trinitario, en la obtención de jalea,” *Rev. ESPAMCIENCIA*, vol. 7, no. 1, pp. 51–58, 2016.
- [2] E. Romero-Cárdenas, M. Fernández-Ronquillo, J. Macías-Onofre, and K. Zúñiga-Gurumendi, “Producción y comercialización del cacao y su incidencia en el desarrollo socioeconómico del cantón Milagro,” *Rev. Cienc. UNEMI*, vol. 9, no. 17, pp. 56–64, 2016.
- [3] El Universo, “Ecuador busca destacar como exportador de chocolatería fina, no solo de cacao,” *Diario El Universo*, Quito, p. 1, 11-Sep-2019.
- [4] A. Arguello-Noboa, “Elaboración de un confite con el exudado del mucílago de cacao,” Universidad Tecnológica Equinoccial, 2015.
- [5] F. Jiménez-Gil and Mariana Bonilla-Culqui, “Aprovechamiento de mucílago y maguey de cacao (*Theobroma cacao*) fino de aroma para la elaboración de mermelada,” Universidad Estatal de Bolívar, 2012.
- [6] C. Flores-Murillo and M. Peñafiel-Pazmiño, “Propiedades bromatológicas, sensoriales y físicas de yogurt suplementado con mucílago de cacao,” *Rev. Científica Mundo la Investig. y el Conoc.*, vol. 3, no. 3, pp. 1342–1353, 2019.
- [7] I. Murillo and M. Quilambaqui, “Evaluación de 2 dietas experimentales con diferentes niveles de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) en las fases de crecimiento y acabado de cuyes (*Cavia porcellus* L.) de raza Andina,” *Esc. Super. Politécnica del Litoral*, pp. 1–6, 2016.
- [8] A. Nayak and B. Bhushan, “An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes,” *J. Environ. Manage.*, vol. 233, pp. 352–370, 2019.
- [9] S. Plazzotta and L. Manzocco, “Food waste valorization,” in *Saving Food*, Elsevier Inc., 2019, pp. 279–313.

- [10] J. Cazorla-García, “Aplicación de la técnica de microencapsulación de betalaínas extraídas a partir de la remolacha (*Beta vulgaris*),” Universidad Técnica de Ambato, 2018.
- [11] A. Márquez-Coronel and E. Salazar-Román, “Análisis de los niveles de desperdicio del mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible,” Universidad Estatal de Milagro, 2015.
- [12] E. Quizhpi-Nieves, “Caracterización del mucílago de cacao CCN-51 mediante espectrofotometría UV-Visible y absorción atómica. Caso: Ecuador-zona 6.,” Universidad de Cuenca, 2016.
- [13] D. Valbuena-Coca and C. Serrano-Acevedo, “Aprovechamiento de la cascarilla de cacao para la generación de un producto derivado en la Asociación de productores orgánicos del municipio de Dibulla (Apomd),” Universidad de la Salle, 2018.
- [14] C. Barén-Cedeño, “Utilización del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.), tipo nacional y CCN-51 en la obtención de dos jaleas a partir de tres formulaciones, Quevedo, Ecuador 2013,” Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2013.
- [15] Real Academia de la Lengua Española, “Mucílago,” *Asociación de Academias de la Lengua Española*, 2019. [Online]. Available: <https://dle.rae.es/mucílago>. [Accessed: 17-Feb-2020].
- [16] Real Academia de la Lengua Española, “Cascarilla,” *Asociación de Academias de la Lengua Española*, 2019. [Online]. Available: <https://dle.rae.es/?w=cascarilla>. [Accessed: 17-Feb-2020].
- [17] J. Ibarra-Bernuy, “Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles en el tuberculo (*Tropaeolum tuberosum*) Mashua naranja,” Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, 2018.
- [18] J. Bonifaz-Nieto, “Efecto de la inclusión de microencapsulados de tomillo en la elaboración de queso fresco,” Universidad Técnica de Ambato, 2019.

- [19] P. Barragán-Valbuena, “Potencial saludable de sustancias bioactivas de algunas verduras,” Pontificia Universidad Javeriana, 2011.
- [20] C. Pássaro-Carvalho *et al.*, “Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones,” Rionegro - Antioquia, 2016.
- [21] M. Quiñones, M. Miguel, and A. Aleixandre, “Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular,” *Nutr. Hosp.*, vol. 27, no. 1, pp. 76–89, 2012.
- [22] M. Castro-Acosta, “Polifenoles: compuestos bioactivos con efectos beneficos en la prevención de diabetes tipo 2,” *REDCieN - Cienc. y Nutr.*, vol. 1, no. 3, p. 6, 2019.
- [23] G. Guerrero, “El Cacao ecuatoriano,” *Revista Líderes*, 2013. .
- [24] R. G.-S. Martín, “Proyecto de factibilidad para la producción de cacao con vista a la exportación en la finca ‘Lesly’ ubicada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas,” Universidad Católica Santiago de Guayaquil, 2018.
- [25] A. López-Guerrero, “Producción y comercialización de cacao Fino de Aroma en el Ecuador - Año 2012-2014”,” Quito, Ecuador, 2017.
- [26] EL Telégrafo, “Exportaciones de cacao subieron 4,65% en 2018,” *Diario El telégrafo*, Quito, 2019.
- [27] G. García-Vidal, L. Guzmán-Vilar, and R. P. Campdesuñer, “Research Trends in Cocoa : Opportunities for Research in Santo,” *SATHIRI, Sembrador*, vol. 12, no. 2, p. 22, 2017.
- [28] M. Montes-Mosquera, “Efectos del fósforo y azufre sobre el rendimiento de mazorcas, en una plantación de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51, en la zona de Babahoyo,” Universidad Técnica de Babahoyo, 2016.
- [29] T. K. Lim, “*Theobroma cacao*,” in *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*, vol. 3, 2012, p. 44.

- [30] W. Miguel-Estrada, X. Romero-Castellano, and J. Moreno-Peraza, “Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas,” 2011.
- [31] G. Aldave-Palacios, “Efecto de la temperatura y tiempo de tostado en los caracteres sensoriales y en las propiedades químicas de granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) procedente de Uchiza , San Martín – Perú para la obtención de NIBS,” Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2016.
- [32] K. Bermúdez-Albia and C. Mendoza-Alcívar, “Post-cosecha y secado del grano del cacao Nacional fino y de aroma para la determinación de perfiles físicos, bromatológicos y organolépticos,” Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, 2016.
- [33] L. Álava-Moreira, “Efecto tiempo - temperatura de tostado del cacao fino de aroma, en sus características fisicoquímicas y organolépticas,” Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, 2016.
- [34] J. De la Cruz, M. Vargas-Ortiz, and A. Coronel, “CACAO: Operaciones Postcosecha,” 2015.
- [35] S. López-Medina and A. Gil-Rivero, “Características germinativas de semillas de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) ‘cacao,’” *Arnaldoa*, vol. 24, no. 2, pp. 609–618, 2017.
- [36] K. Ortiz-Valbuena and R. Álvarez-León, “Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguará (Huila, Colombia),” *Bol. Científico del Cent. Museos Hist. Nat.*, vol. 19, no. 1, pp. 65–84, 2015.
- [37] D. Pava-Sancho, “Eficacia de los métodos de fermentación y secado para optimizar la calidad de las almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.),” Universidad Técnica de Machala, 2016.

- [38] C. Peñaherrera-Chang, “‘Diversidad fenotípica de la mazorca y calidad física de la almendra en 13 clones élites de cacao (*Theobroma cacao* L.)’ en la finca experimental ‘La Represa,’” Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2017.
- [39] Compañía Nacional de Chocolates, “Cosecha, beneficio y calidad del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.),” Medellín, Colombia, 2019.
- [40] Héctor Aguilar, “Actividades de postcosecha para lograr cacao de calidad,” Honduras, 2017.
- [41] A. Dubón, “Protocolo para el beneficiado y calidad del cacao,” Honduras, 2016.
- [42] N. Pinto-Mosquera, “Propuesta de mejora a los factores que afectan la competitividad de la cadena productiva del cacao en grano de la empresa ‘Aroma Amazónico CIA. LTDA,’” Universidad de Las Américas, 2011.
- [43] H. Aguilar, “Guía de buenas prácticas de postcosecha de cacao,” Honduras, 2017.
- [44] J. Jiménez, F. Amores, and E. Solórzano, “Componentes de identidad para reconocer las diferencias del cacao que se produce en varias regiones del Ecuador.,” Quevedo, Ecuador, 2014.
- [45] H. Aguilar, “Manual para la evaluación de la calidad del grano de cacao,” Honduras, 2016.
- [46] A. Pancardo-Lagunas, “Efecto del procesamiento del cacao (*Theobroma cacao* L.) en la capacidad antioxidante durante la obtención de licor y cocoa,” Universidad Veracruzana, 2016.
- [47] Z. Vázquez *et al.*, “Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review,” *Waste Manag.*, vol. 90, pp. 72–83, 2019.
- [48] D. Tenesaca-Fajardo, “Balance energético de la producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao CCN-51 en los cantones Camilo Ponce Enríquez y La Troncal.,” Universidad de Cuenca, 2019.
- [49] S. Villagómez-García, “Optimización y aprovechamiento del residuo (exudado del

- mucílago) de la almendra fresca del cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51 en la elaboración de vinagre,” Universidad Tecnológica Equinoccial, 2013.
- [50] A. Arana-Analuiza and E. Rugel-Jiménez, “Propuesta de aprovechamiento del descho mucílago de cacao en la Hacienda ‘Santa Rita,’” Universidad de Guayaquil, 2017.
- [51] T. Chóez-Bravo, “Vino de cacao: una propuesta novedosa para la utilización de los desechos del cacao,” Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, 2018.
- [52] O. Carrasco-Angel, “Obtención de harina baja en gluten a partir de la cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional,” Universidad Técnica de Machala, 2015.
- [53] C. Tapia-Yáñez, “Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad Arriba y CCN-51 para la elaboración de una infusión,” Universidad Técnica de Ambato, 2015.
- [54] W. Teneda-Llerena, K. Ah-Hen, and R. Lemus-Mondaca, “Characterization of a cocoa (*Theobroma cacao* L., var. Arriba) husks infusion with aromatic herbs,” *Agro Sur*, vol. 43, no. 3, pp. 47–55, 2017.
- [55] F. Terán-Espinoza, “Aprovechamiento de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la elaboración de un producto Agroindustrial,” Universidad de las Américas, 2019.
- [56] G. Franco-Agurto and K. Suárez-Quirumbay, “Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de una bebida láctea elaborada a base de residuos agroindustriales de cacao, café y naranja,” Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2014.
- [57] F. Galarza-Cajamarca, “Estudio de los eslabones de la cadena de valor del cacao en la provincia de El Oro,” Universidad Técnica de Machala, 2015.
- [58] M. Peñarrieta, L. Tejada, P. Mollinedo, J. Vila, and J. Bravo, “Phenolic compounds in food,” *Boliv. J. Chem.*, vol. 31, no. 2, pp. 68–81, 2014.

- [59] M. Mateos-Martín, “Relación estructura/actividad de proantocianidinas obtenidas de diversas fuentes naturales,” Universidad de Barcelona, 2013.
- [60] J. Yépez-Rivadeneira, “Caracterización del contenido de polifenoles: catequina, epicatequina y procianidinas B1, B2, y C1: en caco CCN-51 de las principales zonas productoras del Ecuador,” Universidad Central Del Ecuador, 2017.
- [61] A. Vázquez-Ovando, I. Ovando-Medina, L. Adriano-Anaya, D. Betancur-Ancona, and M. Salvador-Figueroa, “Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma,” *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 66, no. 3, p. 16, 2016.
- [62] E. Jovellanos-Fernández, “Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en polifenoles para el diseño de un chocolate enriquecido,” Universidad de Murcia, 2016.
- [63] J. Duarte and F. Pérez-Viscaíno, “Cardiovascular protection by flavonoids. Pharmacokinetic mystery,” *Ars Pharm.*, vol. 56, no. 4, pp. 193–200, 2015.
- [64] R. Estrada-Reyes, D. Ubaldo-Suárez, and Ana Araujo-Escalona, “Los flavonoides y el sistema nervioso central,” *Salud Ment.*, vol. 35, no. 5, pp. 375–384, 2012.
- [65] L. Cabrera-Soto, Y. Salinas-Moreno, G. Velázquez-Cardelas, and E. Espinosa-Trujillo, “Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas,” *Agrociencia*, vol. 43, no. 8, pp. 827–839, 2009.
- [66] C. Purizaca-Mejía, “Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en *Salvia splendens* (Salvia Roja),” Universidad Católica Los Angeles Chimbote, 2019.
- [67] J. Luna-Guevara, J. López-Fuentes, O. Jiménez-González, and L. Luna-Guevara, “Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión,” *Rev. Iberoam. las Ciencias Biológicas y Agropecu.*, vol. 5, no. 10, p. 11, 2016.

- [68] C. Hernandez-Torres *et al.*, “La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria,” *ICIDCA*, vol. 50, no. 1, pp. 12–19, 2016.
- [69] P. García-Mayordomo, “Compuestos bioactivos en alimentos de origen vegetal,” Universidad Complutense, 2016.
- [70] M. Kazemi, F. Khodaiyan, S. S. Hosseini, and Z. Najari, “An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan,” *Waste Manag.*, vol. 100, pp. 101–111, 2019.
- [71] E. Naziri, N. Nenadis, F. T. Mantzouridou, and M. Z. Tsimidou, “Valorization of the major agrifood industrial by-products and waste from Central Macedonia (Greece) for the recovery of compounds for food applications,” *Food Res. Int.*, vol. 65, pp. 350–358, 2014.
- [72] G. Grillo *et al.*, “Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors,” *Food Res. Int.*, vol. 115, pp. 200–208, 2019.
- [73] E. Lujano, L. Manganiello, A. Contento, and Á. Ríos, “Identification and quantification of (+) - catechins and procyanidins in cocoa from Ocumare de la Costa, Venezuela,” *Rev. Ing. UC*, vol. 26, no. 2, pp. 192–201, 2019.
- [74] Patricia Martínez Lanz, *Manual básico de investigación científica*, Segunda., vol. 6, no. 1. México: Manual Moderno, S.A, 2011.
- [75] S. Espín and I. Samaniego, “Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao,” Quito, Ecuador, 2016.
- [76] I. Samaniego *et al.*, “Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 88, p. 33, 2020.
- [77] R. Martínez, P. Torres, M. A. Meneses, J. G. Figueroa, J. A. Pérez-Álvarez, and M. Viuda-Martos, “Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products,” *Food Res. Int.*, vol. 49, no. 1, pp. 39–45, 2012.

- [78] R. Campos-Vega, K. H. Nieto-Figueroa, and B. D. Oomah, "Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 81, no. November 2017, pp. 172–184, 2018.
- [79] P. C. G. Júnior *et al.*, "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, no. August 2019, p. 106887, 2020.
- [80] R. Gu, Y. Shi, W. Huang, C. Lao, Z. Zou, and S. Pan, "International Immunopharmacology Theobromine mitigates IL-1  $\beta$  -induced oxidative stress , in inflammatory response , and degradation of type II collagen in human chondrocytes," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 82, no. September 2019, p. 106226, 2020.

## **CAPITULO VII**

### **ANEXOS**

## TABLAS DEL ANDEVA DEL MUCÍLAGO DE CACAO VARIEDADES CCN-51 Y NACIONAL

*Anexo 1. Resumen estadístico de Procianidinas B<sub>1</sub> de mucílago de cacao.*

	CCN-51	NACIONAL
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	5,56333	25,68
<b>Desviación Estándar</b>	0,085049	0,45
<b>Coefficiente de Variación</b>	1,52874%	1,75234%
<b>Mínimo</b>	5,48	25,23
<b>Máximo</b>	5,65	26,13
<b>Rango</b>	0,17	0,9
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,12452	0

*Anexo 2. Resumen estadístico de Catequina de mucílago de cacao.*

	CCN-51	NACIONAL
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	2,95	35,4467
<b>Desviación Estándar</b>	0	0,375011
<b>Coefficiente de Variación</b>	0%	1,05796%
<b>Mínimo</b>	2,95	35,07
<b>Máximo</b>	2,95	35,82
<b>Rango</b>	0	0,75
<b>Sesgo Estandarizado</b>	-1,73205	-0,0282812

*Anexo 3. Resumen estadístico de Procianidina B<sub>2</sub> de mucílago de cacao.*

	CCN-51	NACIONAL
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	9,2	35,1
<b>Desviación Estándar</b>	0,1	1,25
<b>Coefficiente de Variación</b>	1,08696%	3,56125%
<b>Mínimo</b>	9,1	33,85
<b>Máximo</b>	9,3	36,35
<b>Rango</b>	0,2	2,5
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0	0

*Anexo 4. Resumen estadístico de Epicatequina de mucílago de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>NACIONAL</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	6,69	13,72
<b>Desviación Estándar</b>	0,12	0,16
<b>Coefficiente de Variación</b>	1,79372%	1,16618%
<b>Mínimo</b>	6,57	13,56
<b>Máximo</b>	6,81	13,88
<b>Rango</b>	0,24	0,32
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0	0

*Anexo 5. Resumen estadístico de Procianidina C<sub>1</sub> de mucílago de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>NACIONAL</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	6,01667	16,83
<b>Desviación Estándar</b>	0,0550757	2,35381
<b>Coefficiente de Variación</b>	0,915386%	13,9858%
<b>Mínimo</b>	5,96	14,13
<b>Máximo</b>	6,07	18,45
<b>Rango</b>	0,11	4,32
<b>Sesgo Estandarizado</b>	-0,191877	-1,15263

*Anexo 6. Resumen estadístico de Cafeína de mucílago de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>NACIONAL</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	1,20333	9,07
<b>Desviación Estándar</b>	0,0152753	0,41
<b>Coefficiente de Variación</b>	1,26941%	4,5204%
<b>Mínimo</b>	1,19	8,66
<b>Máximo</b>	1,22	9,48
<b>Rango</b>	0,03	0,82
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,6613	0

*Anexo 7. Resumen estadístico de Teobromina de mucílago de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>NACIONAL</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	4,85333	26,57
<b>Desviación Estándar</b>	0,135031	0,89
<b>Coefficiente de Variación</b>	2,78223%	3,34964%
<b>Mínimo</b>	4,72	25,68
<b>Máximo</b>	4,99	27,46
<b>Rango</b>	0,27	1,78
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,0785016	0

**TABLAS DE ANDEVA DE LA CASCARILLA DE CACAO VARIEDADES CCN-51  
Y NACIONAL**

*Anexo 8. Resumen estadístico de Catequina de la cascarilla de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>Nacional</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	4,99333	16,1667
<b>Desviación Estándar</b>	0,0057735	0,125033
<b>Coefficiente de Variación</b>	0,115624%	0,773402%
<b>Mínimo</b>	4,99	16,04
<b>Máximo</b>	5,0	16,29
<b>Rango</b>	0,01	0,25
<b>Sesgo Estandarizado</b>	1,22474	-0,0847699

*Anexo 9. Resumen estadístico de Epicatequina de la cascarilla de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>Nacional</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	0,843333	0,84
<b>Desviación Estándar</b>	0,0152753	0,02
<b>Coefficiente de Variación</b>	1,81129%	2,38095%
<b>Mínimo</b>	0,83	0,82
<b>Máximo</b>	0,86	0,86
<b>Rango</b>	0,03	0,04
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,6613	0

*Anexo 10. Resumen estadístico de Cafeína en cascarilla de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>Nacional</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	1,11	3,58
<b>Desviación Estándar</b>	0,02	0,01
<b>Coefficiente de Variación</b>	1,8018%	0,27933%
<b>Mínimo</b>	1,09	3,57
<b>Máximo</b>	1,13	3,59
<b>Rango</b>	0,04	0,02
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0	0

*Anexo 11. Resumen estadístico de Teobromina en cascarilla de cacao.*

	<b>CCN-51</b>	<b>Nacional</b>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	9,27333	12,8867
<b>Desviación Estándar</b>	0,135031	0,220076
<b>Coefficiente de Variación</b>	1,45612%	1,70778%
<b>Mínimo</b>	9,14	12,67
<b>Máximo</b>	9,41	13,11
<b>Rango</b>	0,27	0,44
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,0785016	0,096302

