



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA QUÍMICA

PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS ASOCIADOS A LA
CALIDAD DE MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO
ECUATORIANO

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

QUÍMICA

AUTORA: VALERIA PAULINA TOAQUIZA VALLEJO

DIRECTOR: Dr. CARLOS PILAMUNGA CAPUS PhD.

Riobamba - Ecuador

2022

© 2022, Valeria Paulina Toaquiza Vallejo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, VALERIA PAULINA TOAQUIZA VALLEJO, declaro que el presente trabajo de integración curricular es de mi autoría y los resultados de este son auténticos. Los textos del documento provienen de otras fuentes y se encuentran debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de integración curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 09 de marzo del 2022.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Valeria Paulina Toaquiza Vallejo', enclosed within a faint rectangular border.

Valeria Paulina Toaquiza Vallejo

CI: 171886227-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA QUÍMICA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, **PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DE MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO**, realizado por la señorita: **VALERIA PAULINA TOAQUIZA VALLEJO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de integración curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Robert Alcides Cazar Ramírez PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: ROBERT ALCIDES CAZAR RAMIREZ	2022-03-09
Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	 Firmado electrónicamente por: CARLOS PILAMUNGA	2022-03-09
Ing. Carlos Alcibar Medina Serrano Mgs. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: CARLOS ALCIBAR MEDINA SERRANO	2022-03-09

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico con mucho amor a mis abuelitos, Inés y César, quienes como padres siempre me han ofrecido su amor y ayuda incondicional para que cumpla con éxito todo lo que me he propuesto.

A mi padre, Byron, por ser el principal promotor de mis sueños, por estar ahí en todo momento para ayudarme y animarme a seguir adelante. Te quiero.

A mi hermano, Byron por estar siempre presente en mi vida y a mi madre que desde el cielo siempre vela por nosotros y nos bendice.

Valeria

AGRADECIMIENTO

De manera muy especial agradezco al Dr. Iván Samaniego, director externo del presente trabajo de investigación, por darme la oportunidad de trabajar en el departamento de Nutrición y Calidad, por haberme guiado de inicio a fin en la realización del trabajo de integración curricular, por la confianza en mi depositada, el tiempo dedicado y los conocimientos brindados.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias por permitirme ser parte de su proyecto “Estudio de la expresión y diversidad genética para la determinación de la calidad en clones de cacao nacional centenario del Ecuador”. Mi más profundo agradecimiento por todas las facilidades brindadas (director externo, técnicos, laboratorios, reactivos, documentos bibliográficos propios del instituto y la publicación de información perteneciente única y exclusivamente al INIAP) para la realización de la investigación y publicación del trabajo de integración curricular en la ESPOCH.

A la Dra. Susana Abdo, por su motivación y sobre todo por confiar en mí y en mis capacidades, para realizar este proyecto bajo la dirección del Dr. Iván Samaniego en el INIAP.

Al Dr. Roberth Cazar que, como docente y director de la carrera de Química de la ESPOCH, siempre me ha apoyado para llevar a cabo todos los proyectos académicos que me he propuesto realizar en la institución.

Al Quim. Joseph Mena, quien en todo momento me ha ayudado, animado y acompañado a lo largo de la carrera. Me encantaría querido amigo agradecerte de todo corazón, pero para ti mi corazón no tiene fondo y es que por más que lo intento, no encuentro las palabras para agradecerte tal y como te lo mereces.

A mi familia y a todas aquellas personas que de una u otra forma aportaron en la realización de este trabajo de investigación. Muchas gracias.

Valeria

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Antecedentes	5
1.2. Bases teóricas	6
1.2.1. <i>El cacao</i>	6
1.2.2. <i>Genotipo o variedades de cacao</i>	6
1.2.2.1. <i>Cacao forastero</i>	7
1.2.2.2. <i>Cacao criollo</i>	7
1.2.2.3. <i>Cacao trinitario</i>	7
1.2.2.4. <i>Cacao nacional</i>.....	7
1.2.3. <i>Variiedad clonal del cacao</i>.....	8
1.2.4. <i>Composición físico-química del grano de cacao</i>.....	8
1.2.5. <i>Compuestos químicos no volátiles</i>.....	9
1.2.5.1. <i>Grasa</i>	9
1.2.5.2. <i>Compuestos fenólicos</i>	10
1.2.5.3. <i>Actividad antioxidante</i>.....	13
1.2.5.4. <i>Alcaloides</i>	13
1.2.6. <i>Tratamiento postcosecha o beneficio</i>	14
1.2.6.1. <i>Fermentado</i>.....	14
1.2.6.2. <i>Secado</i>.....	16
1.2.7. <i>Calidad del grano de cacao</i>.....	16
1.2.7.1. <i>Calidad física</i>.....	17
1.2.7.2. <i>Calidad organoléptica</i>.....	17
1.2.8. <i>Calidad de los granos de cacao según la normativa ISO e INEN</i>.....	17
1.2.8.1. <i>ISO 2451:2017 “Granos de cacao-especificaciones y requisitos de calidad”</i>	17
1.2.8.2. <i>NTE INEN 176:2018 Quinta revisión “Granos de cacao. Requisitos”</i>	18

1.2.9.	<i>Fundamento de los métodos y técnicas de análisis</i>	19
1.2.9.1.	<i>Método de extracción Soxhlet</i>	19
1.2.9.2.	<i>HPLC</i>	19
1.2.9.3.	<i>Espectrofotometría UV-Vis</i>	19
1.2.9.4.	<i>Método de Folin Ciocalteu</i>	20
1.2.9.5.	<i>Determinación de flavonoides por el método de tricloruro de aluminio</i>	21
1.2.9.6.	<i>Método de capacidad antioxidante (ABTS y FRAP)</i>	22
1.2.10.	<i>Análisis estadístico</i>	23
1.2.10.1.	<i>ANOVA para diseño factorial de 2 factores</i>	23
1.2.10.2.	<i>Prueba de Tukey</i>	23
1.2.10.3.	<i>Análisis de componentes principales (ACP)</i>	24
1.3.	Bases conceptuales	24
1.3.1.	<i>Actividad antioxidante</i>	24
1.3.2.	<i>Alcaloides</i>	24
1.3.3.	<i>Amargo</i>	24
1.3.4.	<i>Astringencia</i>	25
1.3.5.	<i>Cafeína</i>	25
1.3.6.	<i>Calidad</i>	25
1.3.7.	<i>Componentes bioactivos</i>	25
1.3.8.	<i>Compuestos no volátiles</i>	25
1.3.9.	<i>Fermentación</i>	25
1.3.10.	<i>Flavonoides</i>	26
1.3.11.	<i>Metilxantinas</i>	26
1.3.12.	<i>Polifenoles</i>	26
1.3.13.	<i>Teobromina</i>	26
1.3.14.	<i>Variedad clonal</i>	26

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	27
2.1.	Tipo de investigación	27
2.1.1.	<i>Por el método de investigación</i>	27
2.1.2.	<i>Según el objetivo</i>	27
2.1.3.	<i>Según el nivel de profundidad en el objeto de estudio</i>	27
2.1.4.	<i>Según la manipulación de variables</i>	27
2.1.5.	<i>Según el tipo de inferencia</i>	28
2.1.6.	<i>Según el periodo temporal</i>	28

2.1.7.	<i>Por el lugar de estudio</i>	28
2.2.	Diseño de la investigación	28
2.3.	Identificación de variables	30
2.4.	Planteamiento de la hipótesis	30
2.5.	Localización del estudio	32
2.6.	Población de estudio	32
2.7.	Técnica de recolección de datos	33
2.8.	Procedimiento	33
2.8.1.	<i>Primera etapa: pretratamiento de la muestra.</i>	33
2.8.1.1.	<i>Muestreo.</i>	33
2.8.1.2.	<i>Proceso de fermentación</i>	33
2.8.1.3.	<i>Secado</i>	33
2.8.1.4.	<i>Almacenamiento de la muestra</i>	34
2.8.2.	<i>Segunda etapa: análisis de compuestos químicos no volátiles.</i>	34
2.8.2.1.	<i>Desengrasado de la muestra por el método Soxhlet</i>	34
2.8.2.2.	<i>Procedimientos específicos.</i>	34

CAPÍTULO III

3.	DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	40
3.1.	Contenido de grasa (G).	40
3.2.	Contenido de compuestos fenólicos (PT, FT, CAT, EPI, PC-B2, PC-C1)	42
3.2.1.	<i>Contenido de polifenoles totales (PT).</i>	42
3.2.2.	<i>Contenido de flavonoides totales (FT)</i>	45
3.2.3.	<i>Contenido de flavan-3-oles (CAT y EPI) y procianidinas (B2 y C1).</i>	47
3.3.	Actividad antioxidante (ABTS y FRAP)	51
3.4.	Contenido de alcaloides (TBR y CAF)	55
3.5.	Análisis de componentes principales (ACP) en cacaos ecuatorianos	60

CONCLUSIONES	63
---------------------------	----

RECOMENDACIONES	64
------------------------------	----

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Composición química del grano de cacao fermentado y secado.	9
Tabla 2-1:	Requisitos físicos y calidad para los granos de cacao.	18
Tabla 3-1:	Tabla del análisis de varianza (ANOVA) para diseño bifactorial.....	23
Tabla 4-2:	Diseño experimental para análisis de componentes químicos no volátiles de cacao ecuatoriano.	29
Tabla 5-2:	Diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial 6 x 2 con 2 repeticiones.....	29
Tabla 6-2:	Operacionalización de variables.....	31
Tabla 7-2:	Tamaño de la muestra	32
Tabla 8-3:	Contenido promedio de G (g grasa/100g cacao en BS) en materiales seleccionados (MS) de cacao ecuatoriano.	40
Tabla 9-3:	Contenido promedio de PT (mg GAE/g cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.	43
Tabla 10-3:	Variación del contenido de PT entre almendras sin fermentar y fermentadas de materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.	44
Tabla 11-3:	Contenido promedio de FT (mg CAT/g cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.	45
Tabla 12-3:	Variación del contenido de FT entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano.	46
Tabla 13-3:	Contenido promedio de CAT, EPI, PC-B2 y PC-C1 (mg polifenol/g cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.....	48
Tabla 14-3:	Variación del contenido de CAT, EPI, PC-B2 y PC-C1 entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano.....	50
Tabla 15-3:	Capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) promedio (μmol Trolox/g cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.....	52
Tabla 16-3:	Variación de la actividad antioxidante por el método FRAP y ABTS entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano.	53
Tabla 17-3:	Contenido promedio de TBR y CAF (g alcaloide/ 100g cacao desengrasado en BS) en muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano.	56
Tabla 18-3:	Variación del contenido de TBR y CAF entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Estructura química de flavonoides, antocianinas y flavan-3-oles	12
Figura 2-1:	Estructura química de flavan-3-oles de cacao: (+)-catequina y (-)-epicatequina	12
Figura 3-1:	Estructura química de algunas procianidinas presentes en el cacao	12
Figura 4-1:	Estructura química de las metilxantinas. Teobromina (A) y Cafeína (B).....	14
Figura 5-1:	Fermentación alcohólica y fermentación acética en las almendras de cacao durante el proceso beneficio o postcosecha.....	15
Figura 6-1:	Oxidación de polifenoles en ensayo de Folin-Ciocalteu. Procedimiento basado en la transferencia de electrones en un entorno básico, mediante sustancias reductoras..	20
Figura 7-1:	Formación del complejo de aluminio-flavonoide en medio básico.....	21
Figura 8-1:	Estructura del ABTS+ antes y después de la reacción con el antioxidante. En orden inverso, se forma el radical ABTS con un oxidante fuerte (persulfato de potasio).....	22
Figura 9-1:	Fundamento del método FRAP, mostrando la reducción del 2,4,6-tripiridil-triazina férrica (TPTZ)	23

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1:	Clasificación de compuestos fenólicos según el número de subunidades de fenol y la jerarquía de los flavonoides comunes monómeros y polímeros.....	11
Gráfico 2-3:	Correlación entre el contenido de PT y la eficacia de la actividad antioxidante (ABTS).....	54
Gráfico 3-3:	Correlación entre el contenido de PT y la eficacia de la actividad antioxidante (FRAP).....	55
Gráfico 4-3:	Relación entre el contenido de metilxantinas y el genotipo de cacao	59
Gráfico 5-3:	Proyección de las variables en el plano.....	60
Gráfico 6-3:	Proyección de 6 genotipos de cacao ecuatoriano con 2 niveles de fermentación (12 individuos) en el plano.....	61

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CONTENIDO DE CQNV (GRASA, COMPUESTOS FENÓLICOS, METILXANTINAS) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR
- ANEXO B:** CONTENIDOS PROMEDIO DE CQNV (GRASA, COMPUESTOS FENÓLICOS, METILXANTINAS) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR
- ANEXO C:** ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE G EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR
- ANEXO D:** ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE PT EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR
- ANEXO E:** ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE FT EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.
- ANEXO F:** ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE CAT, EPI, PC-B2 Y PC-C1 EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR
- ANEXO G:** ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (ABTS Y FRAP) EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR
- ANEXO H:** ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE TBR y CAF EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR
- ANEXO I:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE G EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO

- ANEXO J:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE PT EN MUESTRAS SELECCIONADAS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO K:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE FT EN MUESTRAS SELECCIONADAS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO L:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE CAT EN MUESTRAS SELECCIONADAS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO M:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE EPI EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO N:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE PC-B2 EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO O:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE PC-C1 EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO P:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR ABTS EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO Q:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR FRAP EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO R:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE TBR EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO S:** PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE CAF EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO
- ANEXO T:** FLUJOGRAMA PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE GRANOS DE CACAO SELECCIONADO. PRIMERA ETAPA: PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA
- ANEXO U:** FLUJOGRAMA PARA EL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO. SEGUNDA ETAPA: ANÁLISIS DE COMPUESTOS QUÍMICOS NO VOLÁTILES
- ANEXO V:** PRETRATAMIENTO: PELADO Y MOLIDO (MOLINO ULTRACENTRÍFUGO ZM 200) DE MUESTRAS DE CACAO SELECCIONADO
- ANEXO W:** (A) DESENGRASADO EN EQUIPO SOXHLET (B) EXTRACCIÓN Y SECADO DEL CACAO DESENGRASADO (C) DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA
- ANEXO X:** (A) PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO EN LOS DIFERENTES CACAOS; (B) ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS; (C) Y (D) CUANTIFICACIÓN DE PT EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS.

- ANEXO Y:** (A) Y (B) ADICIÓN DE AlCl_3 E NaOH EN EXTRACTOS DE CACAO; (C) CUANTIFICACIÓN DE FT EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS
- ANEXO Z:** (A) ADICIÓN DE ACETONA/AGUA/ÁCIDO FÓRMICO A CACAOS DESENGRASADOS; (B) PREPARACIÓN DE MUESTRAS EN HOMOGENIZADOR DE SOBREMESA (FASTPREP-24™ CLASSIC INSTRUMENT) Y CENTRÍFUGA REFRIGERADA (SIGMA 4-16KS); (C) FILTRACIÓN DE MUESTRAS PARA CUANTIFICAR CAT, EPI, PC-B2 Y PC-C1 EN HPLC
- ANEXO AA:** (A) PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ACTIVADA ABTS⁺; (B) ADICIÓN DE ABTS A EXTRACTOS DE CACAO (C) DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR ABTS EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS
- ANEXO BB:** (A) ADICIÓN DE FERROCIANIDA DE POTASIO Y SOLUCIÓN TAMPÓN A EXTRACTOS DE CACAO; (B) ADICIÓN DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO Y CLORURO FÉRRICO; (C) DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR FRAP EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS
- ANEXO CC:** (A) Y (B) PREPARACIÓN DE FASE MÓVIL Y ESTÁNDARES; (C) ADECUAMIENTO DE MUESTRAS DE CACAO CON CARREZ 1 Y CARREZ 2; (D) CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES (TBR Y CAF) EN HPLC
- ANEXO DD:** (A) ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS (UV-VIS-2600 SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU); (B) HPLC (AGILENT TECHNOLOGIES)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABTS	Actividad antioxidante por el método ABTS
ACP	Análisis de Componentes Principales
BS	Base Seca
CAF	Cafeína (metilxantina)
CAT	(+)-Catequina (flavan-3-ol)
CCN	Colección Castro Naranjal
CCNC	Colección de Cacao Nacional Centenario
CP	Componentes Principales
CQNV	Componentes Químicos no volátiles del cacao
EPI	(-)-Epicatequina (flavan-3ol)
FRAP	Actividad antioxidante por el método FRAP
G	Grasa
GAE	Ácido Gálico Equivalente
H	Humedad
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
ICS	Imperial College Selection
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
LSAIA	Laboratorio de Servicios y Análisis e Investigación en Alimentos del INIAP
MS	Material Seleccionado de cacao
NF	Nivel de Fermentación
PC-B2	Procianidina B2
PC-C1	Procianidina C1
SD	Desviación Estándar
TBR	Teobromina (metilxantina)

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de los principales componentes químicos no volátiles (CQNV) asociados a la calidad de seis materiales seleccionados de cacao (*Theobroma cacao L.*), procedentes de la colección de cacaos ecuatorianos de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP. Con este fin, se prepararon extractos acuosos a partir de las almendras molidas y desengrasadas de cada genotipo de cacao fermentado y sin fermentar; en estos extractos orgánicos se determinó el contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-Visible; mientras que los alcaloides y el perfil fenólico se cuantificaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Los resultados obtenidos permitieron establecer que el nivel de fermentación y el genotipo tienen un efecto significativo sobre el contenido de CQNV; también, se determinó que el proceso fermentativo disminuye el contenido de compuestos bioactivos y que los genotipos CCN-51, EEB-8 e ICS-95 fermentados y sin fermentar destacan por su alto contenido de CQNV, lo cual les agrega valor por sus efectos benéficos para la salud. Por otro lado, se determinó que existe una correlación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante; además, se utilizó la relación Teobromina/ Cafeína para clasificar a los cacaos por su origen genético, de manera que todos los materiales seleccionados se enmarcaron como cacaos “finos” de tipo Trinitario. Los resultados permitieron generar una herramienta objetiva que permite valorizar a los materiales por sus características químicas intrínsecas, con la finalidad de agregar valor al cacao ecuatoriano. Se recomienda complementar el presente estudio con análisis sensoriales y con la evaluación del perfil de compuestos químicos volátiles, para con este tipo de trabajos reafirmar la calidad del cacao nacional.

Palabras clave: <COMPUESTOS QUÍMICOS NO VOLÁTILES (CQNV)>, <MATERIALES SELECCIONADOS>, <ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE>, <FERMENTACIÓN>, <COMPUESTOS FENÓLICOS>, <ALCALOIDES>.

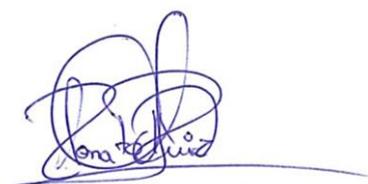


0992-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the content of the main non-volatile chemical components (CQNV) associated with the quality of six selected cocoa materials (*Theobroma cacao L.*), from the Ecuadorian cocoa collection of the Littoral Sur Experimental Station of INIAP. With this kilometer, aqueous extracts were prepared from the ground and degreased almonds of each genotype of fermented and unfermented cocoa; in these organic extracts, the content of total polyphenols, total flavonoids and antioxidant activity was determined by UV-Visible spectrophotometry; while alkaloids and phenolic profile were quantified by High Resolution Liquid Chromatography (HPLC). The results gotten allowed to establish that the level of fermentation and the genotype have a significant effect on the content of CQNV; Also, it was determined that the fermentation process decreases the content of bioactive compounds and that the genotypes CCN-51, EEB-8 and ICS-95 fermented and unfermented stand out for their high content of CQNV, which adds value for their beneficial effects on health. On the other hand, it was determined that there is a linear correlation between the content of phenolic compounds and the antioxidant capacity; In addition, the Theobromine/Caffeine ratio was used to classify cocoas by their genetic origin, so that all the selected materials were framed as "fine" Cocoas of the Trinitarian type. The results allowed to generate an objective tool that allows to valorize the materials for their intrinsic chemical characteristics, in order to add value to Ecuadorian cocoa. It is recommended to complement this study with sensory analysis and with the evaluation of the profile of volatile chemical compounds, in order to reaffirm the quality of national cocoa with this type of work.

Keywords: <NON-VOLATILE CHEMICAL COMPOUNDS CQN>, <SELECTED MATERIALS>, <ANTIOXIDANT ACTIVITY>, <FERMENTATION>, <PHENOLIC COMPOUNDS>, <ALKALOIDS>.



Lcdo. Edison Renato Ruíz López

CI: 0603957044

INTRODUCCIÓN

Actualmente el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Ecuador representa uno de los rubros de mayor importancia económica. Según datos proporcionados por el Boletín de Cuentas del Banco Central del Ecuador, para el primer trimestre de este año; el Valor Agregado Bruto (VAB) no petrolero incrementó en un 0.9%, gracias al dinamismo de varios sectores productivos como el de la agricultura, que creció en un 2.2%; resaltándose el desempeño positivo de cultivos como el cacao (Banco Central del Ecuador, 2021). En este contexto, es importante remarcar que nuestro país es reconocido a nivel mundial; por las características organolépticas singulares e inimitables, así como por su rica composición de compuestos bioactivos y sus características de calidad (Clímaco, 2008, p. 1; Espín & Samaniego, 2016, p. 3; Rivera et al., 2012, p. 8).

La identificación de los mejores genotipos de cacao basado en la producción de alta calidad, se ha convertido en una prioridad para los países cacaoteros. Con este fin, se consideran diversos factores de los cuales depende la calidad de las almendras de cacao, como el genotipo, el manejo agronómico, las condiciones del suelo, las condiciones climáticas, y el factor más importante el manejo postcosecha (fermentación y secado de los granos) (Afoakwa et al., 2008, p. 5; Hernández et al., 2022, pp. 1–2; Samaniego, 2020, p. 35; Verdesoto, 2009, p. 38). Esta calidad se evalúa a través de parámetros físicos, organolépticos y químicos, siendo estos últimos atributos propios del tipo de cacao, o desarrollados durante el proceso de fermentación, secado y torrefacción. Actualmente la calidad del cacao ecuatoriano beneficiado se evalúa mediante la norma técnica NTE INEN 176: 2018, la misma que utiliza solamente parámetros físicos y adicionalmente análisis sensoriales, los cuales son subjetivos. En este sentido, a nivel mundial se han propuesto índices de calidad basados en la evaluación simultánea de componentes bioquímicos de los granos, que influyen sobre el sabor y aroma del cacao y que son utilizados principalmente para la fabricación de chocolate (Hernández et al., 2022, p. 1; Ortiz et al., 2019, p. 41; Perea, 2019, p. 150; Rivera et al., 2012, p. 8).

En este contexto, el presente trabajo de investigación aportará con información sobre la composición química del cacao ecuatoriano, con la finalidad de generar índices de calidad que certifiquen el origen de este tipo especial de cacao muy demandado en el mercado internacional. Para lo cual, se evaluará la capacidad antioxidante y el contenido de los principales componentes químicos no volátiles (grasas, polifenoles totales, flavonoides totales, catequinas, epicatequinas, procianidinas y alcaloides) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano (EEB-8; Trinitario ICS-95; Nacional EET-103; CCN-51; Nacional Centenario 037L; Nacional Centenario 262M) sin fermentación y con cuatro días de fermentación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ecuador, es reconocido actualmente como el primer exportador de cacao en grano en América y el cuarto en el mundo; esto se debe principalmente a las características sensoriales que presentan sus almendras (MAGAP, 2018). Sin embargo, el país podría perder competitividad en la calidad del cacao exportado, debido a los cruzamientos genéticos y al mal manejo postcosecha que se realiza. Los cruzamientos naturales que se han ido formando a través de los años, han hecho muy difícil definir sus características químicas y morfológicas para diferenciarlo del resto de cacaos, creando incertidumbre y desconfianza entre los operadores internacionales sobre el origen de los cacaos finos que se ofertan en el mercado, así como la falta de herramientas objetivas para su certificación y adecuada diferenciación dificultan los procesos de valorización (Espín & Samaniego, 2016, p. 3; Samaniego, 2020).

Actualmente, la calidad del cacao ecuatoriano se evalúa mediante parámetros físicos y análisis sensoriales, de acuerdo a las normativas propuestas nacionalmente por el INEN o internacionalmente por la ISO. Por otra parte, los análisis sensoriales son subjetivos, dependen de la preparación de un panel de catadores que tenga calificación y experiencia en estas pruebas, por lo cual los resultados son variables. En este sentido, la tendencia mundial es la identificación y cuantificación de componentes químicos intrínsecos de los granos de cacao, en función de los cuales se puedan generar índices de calidad como herramientas de certificación de origen que permitan mejorar los precios en el mercado internacional. (INEN 176, 2018; Internacional Organization for Standardization, 2017).

A nivel nacional, existe poca información respecto a la composición química de los distintos genotipos de cacao ecuatoriano, puesto que, las investigaciones realizadas se han centrado en estudios de la calidad organoléptica y parámetros físicos de acuerdo a las normativas actuales, por lo cual; es necesario evaluar la composición química de los genotipos existentes en el país y el efecto de diversos factores que modifican los contenidos, como el proceso de fermentación y secado donde ocurren una serie de reacciones bioquímicas en el cotiledón, que conducen a la formación de precursores de sabor y aroma.

Formulación del problema

¿Por qué evaluar los principales componentes químicos asociados a la calidad de materiales seleccionados de cacao ecuatoriano?

JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador se produce un tipo especial de cacao, que presenta características individuales distintivas de sabores y aromas diferentes que lo hacen único y especial, por lo cual; es reconocido con la denominación de sabor arriba. Estas cualidades únicas del cacao ecuatoriano, junto al creciente interés mundial por caracterizar la composición química del grano, han impulsado la presente investigación, con la finalidad de cuantificar los principales componentes químicos (grasas, compuestos fenólicos y alcaloides) que permitan definir índices objetivos de calidad, que contribuyan a diferenciar este tipo especial de cacao con los producidos en otras partes del mundo y así mejorar los precios en el mercado internacional.

Cabe decir que, algunos de los resultados obtenidos serían inéditos en el sector cacaotero del país; además, esta información junto a la obtenida en investigaciones previas, serviría como base de datos referenciales a nivel nacional para diferentes productores e industrias relacionadas. Finalmente, este trabajo podría contribuir en un futuro a establecer parámetros químicos que normen la calidad del cacao, en base a la composición del mismo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar los principales componentes químicos asociados a la calidad de materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.

Objetivos Específicos

- Cuantificar el contenido de grasa, compuestos fenólicos, alcaloides y la actividad antioxidante de seis materiales seleccionados de cacao ecuatoriano, utilizando técnicas instrumentales de análisis.
- Determinar el efecto del proceso de fermentación y secado sobre el contenido de grasa, compuestos fenólicos, alcaloides y la actividad antioxidante en seis materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.
- Evaluar la relación entre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante, generando información científica que permita agregar valor al cacao ecuatoriano por sus efectos benéficos para la salud.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

A nivel internacional se han llevado a cabo diversas investigaciones para determinar la composición química del cacao. En este contexto, (Vázquez et al., 2016, pp. 3–5) analizó la implicación que tiene la fracción no volátil (como alcaloides y polifenoles) sobre el sabor y aroma de este grano. Por una parte, (De la cruz Perea et al., 2018) y (Gbogbri, 2020, p. 143) estudiaron la evolución de estos componentes químicos durante el tratamiento postcosecha, demostrando que la fermentación influye sobre la capacidad antioxidante de las almendras. Además, estudios realizados por (Nara et al., 2016, p. 3) y (Oracz & Nebesny, 2016, p. 1242) reportaron la relación que existe entre la actividad antioxidante de los granos de cacao con sus propiedades organolépticas. Por otro lado, tanto (Peláez et al., 2016b, pp. 6–8), como (Peláez et al., 2016a, p. 9) y (Zapata et al., 2013, p. 7) proporcionaron datos cuantitativos sobre el contenido de teobromina y cafeína en algunas variedades clonales de cacao. En esta línea de investigación, (Hernández et al., 2022, p. 1) evaluaron e identificaron varios genotipos de cacao según la composición química de muestras fermentadas y secas; para ello se ha determinado el contenido de grasa, fenoles totales, compuestos fenólicos y teobromina.

A nivel nacional, (Samaniego, 2020, p. 101) caracterizó los componentes químicos no volátiles presentes en granos de cacao “Nacional” fermentados y secos, los cuales constituyen precursores de sabores y aromas específicos. Por otra parte, (Yanzapanta, 2014, pp. 58–85) y (Camino, 2014, p. 14) evaluaron la variación del contenido de grasa, polifenoles totales y alcaloides en cacao “Nacional” de diferentes zonas geográficas de producción. En esta línea de investigación, se ha establecido mediante estudios científicos realizados a nivel nacional e internacional, que los componentes químicos presentes en los granos de cacao se encuentran directamente relacionados con su calidad. Adicionalmente, se ha demostrado que su contenido se ve influenciado por diferentes factores, entre los cuales se destaca el tratamiento postcosecha (fermentación y secado), puesto que en esta etapa; estos componentes reaccionan entre sí formando precursores de sabor y aroma que inciden directamente en la calidad organoléptica del cacao.

Finalmente, el manual realizado por (Espín & Samaniego, 2016, pp. 21-44) brindó el modelo metodológico que se siguió en este estudio; ya que en él se describen los procedimientos para el análisis de diferentes parámetros químicos (humedad, contenido de grasa, polifenoles totales y alcaloides) asociados a la calidad del cacao.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. *El cacao*

El árbol de cacao (*Theobroma cacao L*) es una especie endémica de las regiones tropicales y subtropicales de América. Su taxonomía indica que pertenece a la familia *Esterculiaceae*, al género *Theobroma*, y a la especie *Theobroma cacao*, que es una de las más cultivadas al rededor del mundo (Afoakwa, 2014, p. 9). Geográficamente, las mayores áreas cacaoteras están concentradas entre los 15° de latitud Norte y Sur de la línea ecuatorial, lo que favorece su cultivo en aproximadamente 51 países que están distribuidos entre América Latina, el Oeste Africano y el Sur de Asia (Perea, 2019, p. 20; Quispe, 2013, p. 3).

El árbol de cacao mide de 4 a 8m de alto; se tarda entre 4 a 5 años en producir frutos, y de 8 a 10 años en lograr su máximo desarrollo. El fruto es una mazorca que mide de 10 a 32cm de largo por 7 a 10cm de ancho, puede ser de color amarillo, verde, blanco o rojo según la variedad y estado de madurez; además contiene de 20 a 60 semillas o granos en su interior. Bajo la envoltura del grano, se encuentra el embrión que contiene dos cotiledones que pueden ser de color blanco, castaño claro, gris o violeta pardo (Samaniego, 2020, pp. 3–4; Wakao, 2002, p. 7).

1.2.2. *Genotipo o variedades de cacao*

El árbol cacaotero cuenta con más de 14.000 grupos genéticos distintos, cuyas variedades principales son: Forastero, Criollo, Trinitario y Nacional del Ecuador. A su vez, esta clasificación se puede catalogar comercialmente en dos grupos:

- Común o a granel (Bulk): proviene de la especie Forastero (África, Asia y Brasil) y constituye el 95% de la producción mundial de cacao. Su ventaja competitiva es que son más productivos y resistentes a enfermedades.
- Fino o de aroma (Flavor): proviene de la especie Criollo o Trinitario (Ecuador, Indonesia, Papua Nueva Guinea, Colombia, Venezuela y Trinidad). Constituye junto con el cacao Nacional el 5% de la producción mundial de cacao. Destacan por sus características sensoriales, pero mantienen bajos rendimientos y son más sensibles a enfermedades (Camino, 2014, pp. 2–3; Samaniego, 2020, pp. 4–18).

Las variedades de cacao se pueden distinguir por las características morfológicas de sus frutos, el origen geográfico, así como las características de sabor y aroma. En este sentido, el genotipo es un factor muy importante a considerar, ya que influye en la apariencia (forma, color, textura superficial), composición (volátil o no volátil), y calidad organoléptica (sabor, olor, color) de la almendra de cacao (Afoakwa, 2014, p. 17; Edem et al., 2016, pp. 2–3; Portillo et al., 2009, p. 2; Samaniego, 2020, p. 4).

1.2.2.1. *Cacao forastero*

Proviene de la cuenca amazónica, se cultiva principalmente en América Central, Antillas, Brasil y sobre todo en África Occidental. Se caracteriza por ser de calidad ordinaria, con un excelente rendimiento y resistencia a las enfermedades. Es poco perfumado, astringente e incluso presenta un sabor muy fuerte a chocolate que lo diferencia de las otras variedades de cacao. Su fruto es amarillo, liso, con semillas pequeñas, planas, y cotiledones violetas (Benítez, 2015, p. 52; Edem et al., 2016, p. 2; Perea, 2019, p. 25; Samaniego, 2020, pp. 24–25).

1.2.2.2. *Cacao criollo*

Originario del Alto Amazonas; se encuentra actualmente en América Central, Venezuela y en pocas regiones de Asia. El cacao criollo suramericano, tiene la mazorca amarilla o roja averrugada, con semillas grandes redondeadas, y cotiledones de color blanco o púrpura muy pálido. Tiene escasa variabilidad genética; presenta un aroma frutal-floral ligeramente amargo con notas de frutos secos, así como un sabor débil a chocolate, pero refinado. Se caracteriza por ser de calidad excepcional (cacao fino) debido a que sus granos son muy aromáticos. Sin embargo, es la variedad menos fructífera y la más susceptible a enfermedades e insectos, por esta razón es la menos cultivada (Afoakwa, 2014, p. 16; G.A.R Wood & R.A Lass, 2008, pp. 14–15; Perea, 2019, pp. 25–26; Samaniego, 2020, p. 26).

1.2.2.3. *Cacao trinitario*

Desarrollado en Trinidad, y extendido a países como: Venezuela, Ecuador, Sri Lanka, entre otros. Constituye un híbrido natural entre el cacao Criollo y Forastero, por ello presenta propiedades intermedias respecto a morfología, niveles de producción, características gustativas/olfativas, resistencia a enfermedades y plagas (Afoakwa, 2014, p. 16; Samaniego, 2020, p. 26). Se caracteriza por ser de calidad, tener un buen rendimiento, y un aroma interesante debido a sus notas frutales achocolatadas; además, de un sabor a vino que no se encuentra en otro tipo de cacao (G.A.R Wood & R.A Lass, 2008, p. 464; Samaniego, 2020, p. 6).

1.2.2.4. *Cacao nacional*

Cultivado en Ecuador, reconocido con la denominación de sabor “Arriba”, y clasificado como cacao “Fino y de Aroma” (Samaniego, 2020, p. 6). Se caracteriza por tener una fermentación muy corta, y dar un chocolate suave de buena calidad organoléptica. Sus notas aromáticas florales,

frutales, especiadas, acarameladas, y a frutos verdes; hacen que el cacao ecuatoriano sea único además de especial. Presenta una

La fermentación es la etapa más importante, compleja y dinámica del proceso postcosecha, debido a la variedad de sustratos, y la diversidad de microorganismos que intervienen en la descomposición de la pulpa, para dejar solamente la semilla del cacao. Los cambios morfológica rugosa, con crestas bastante profundas, tiene vainas largas y verdes, con almendras grandes de color purpura pálido (G.A.R Wood & R.A Lass, 2008, p. 464).

1.2.3. Variedad clonal del cacao

La variedad clonal es el conjunto de plantas genéticamente idénticas; aunque no necesariamente iguales fenotípicamente en todas sus características, ya que su comportamiento depende de la interacción genotipo-ambiente. Por consecuencia, una planta varía en su apariencia, producción, frutos o almendras (Chacón, 2020; Lucero, 2014, pp. 24–25).

Para obtener granos con mejores características físicas, químicas y organolépticas; el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) realiza investigaciones de mejoramiento genético en el “Programa Nacional de Cacao”. De esta manera pretende aumentar el rendimiento, la resistencia a plagas o enfermedades, y sobre todo mantener las características de sabor y aroma (INIAP, 2018). En estos programas se han seleccionado clones que provienen del INIAP, como el EET- (Estación Experimental Tropical); materiales introducidos de Trinidad conocidos como ICS- (Imperial College Selection); también se mantiene la denominada CCNC (Colección de Cacao Nacional Centenario); y finalmente al cacao clonal CCN-51 (Colección Castro Naranjal) (INIAP, 2019, p. 13; Vera et al., 1984, p. 1).

1.2.4. Composición físico-química del grano de cacao

El cacao está conformado por: cáscara (50%), pulpa (25%) y semillas (25%), las cuales, a su vez, están compuestas por la testa o cascarilla que representa del 12 al 15% del peso del grano seco y del 85 al 88% constituyen los cotiledones, también llamados grano o almendra de cacao (Perea, 2019, p. 32).

Los granos fermentados y secos tienen una rica composición que influye en el sabor y aroma. Están constituidos por metabolitos primarios como: carbohidratos, lípidos y proteínas; al igual que metabolitos secundarios como: compuestos fenólicos y bases nitrogenadas como los alcaloides (metilxantinas) (Samaniego, 2020, p. 20). Cabe decir que el sabor y aroma del fruto depende de la fracción volátil de los componentes activos del sabor, así como, de la fracción no volátil, ya que estos participan de forma directa en la formación de sabores específicos, y de forma indirecta como precursores de moléculas que participan en el olor (Vázquez et al., 2016, p. 247).

1.2.5. *Compuestos químicos no volátiles*

Los principales constituyentes bioquímicos del cacao son: lípidos (48-57%), polifenoles (8-20%), proteínas (9%), y carbohidratos (celulosa 9%, almidón 4.5-7%, pectina 4.1%); estas fracciones representan más del 95% de la composición del grano, aunque también se encuentran en ellos metilxantinas como la Teobromina (1.3-2%) y la Cafeína (0.1-0.7%) (Samaniego, 2020, p. 40).

Tabla 1-1: Composición química del grano de cacao fermentado y secado

Compuesto	Contenido (%)
Grasa	48 – 57%
Compuestos fenólicos	8 – 20
Celulosa	9
Almidón	4,5 – 7
Pectina	4,1
Cenizas	2,4 – 4,2
Teobromina	1,3 – 2
Aminoácidos libres	0,8
Cafeína	0,1 – 0,7
Glucosa	0,1
Fructosa	0,4 – 0,6
Ácidos orgánicos	0,05 – 0,5*

*Por cada ácido orgánico (málico, láctico, cítrico).

Fuente: Samaniego, 2020, p. 40.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

1.2.5.1. *Grasa*

Es el componente cuantitativo y cualitativamente más importante de la semilla de cacao; debido a que puede representar la mitad de los constituyentes (48-57% del peso seco) del cotiledón, y porque juega un papel muy valioso en la formación del aroma. La grasa del cacao está compuesta en un 3% por glicolípidos y materia insaponificable; mientras que el 97% lo constituye glicerolípidos, principalmente triacilgliceroles, que contienen ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) e insaturados (oleico, linoleico, etc), que confieren a la manteca de cacao excelentes características de cristalización, dureza, maleabilidad, fusión (intervalo relativamente estrecho, 30-40°C), estabilidad a la auto oxidación y a la alteración microbiana (Espín & Samaniego, 2016, p. 17; Perea, 2019, p. 32; Servent et al., 2018, p. 3).

1.2.5.2. *Compuestos fenólicos*

- **Polifenoles**

Constituye el grupo de sustancias más numeroso, heterogéneo y ampliamente distribuido en el reino vegetal. Son compuestos bioactivos cuya estructura química consiste en anillos aromáticos, y grupos hidroxilo. Estos metabolitos secundarios se encuentran fuertemente asociados con la actividad antioxidante, y con las características organolépticas del cacao; como el color violeta, el sabor astringente y amargo que contribuye en la formación de sabores verdes y afrutados (Zapata et al., 2013, pp. 392–393). Están relacionados con la calidad sensorial, ya que participan de manera directa en el sabor de las almendras y de manera indirecta como precursores de moléculas que participan en el olor. Representan del 12 al 18% del peso seco en las almendras, y se almacenan en las células pigmentarias de los cotiledones, que en función del contenido de antocianinas; presentan un color que varía de blanco a violeta intenso. Siendo el color violeta un indicador de que las semillas se encuentran asociadas a una mayor concentración de estos compuestos. Los polifenoles en el cacao están conformados mayoritariamente por flavonoides y ácidos fenólicos (Perea, 2019, p. 36; Samaniego, 2020, pp. 27–32).

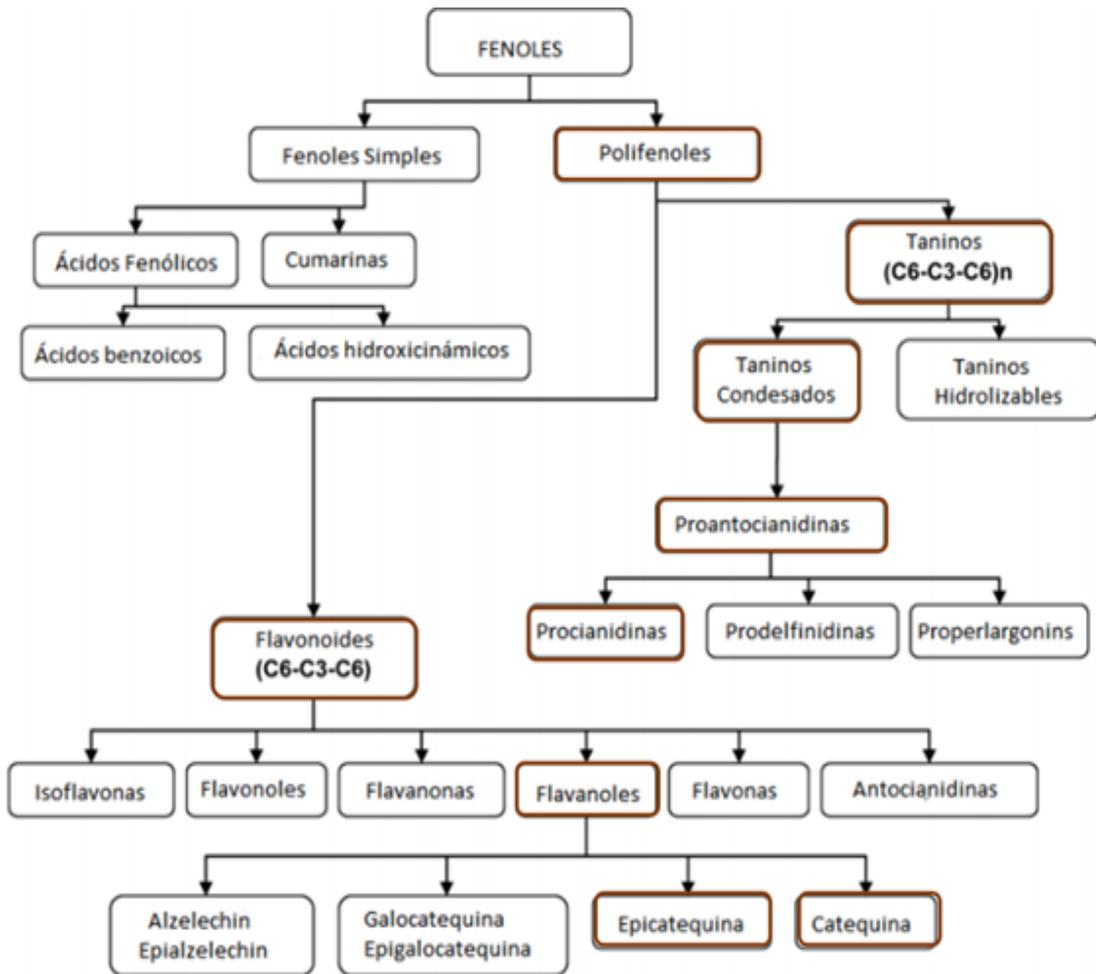


Gráfico 1-1: Clasificación de compuestos fenólicos según el número de subunidades de fenol y la jerarquía de los flavonoides comunes monómeros y polímeros

Fuente: Yanzapanta, 2014, p. 57.

- **Flavonoides**

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran en un alto porcentaje en las almendras de cacao. Su estructura química básica consiste en un esqueleto carbonado ($C_6-C_3-C_6$), en el que dos anillos bencénicos sustituidos (A y B) se unen mediante un anillo heterocíclico con oxígeno (C). La estructura de estos componentes los hace solubles en agua, metanol y etanol, debido a que sus grupos hidroxilo permiten el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes (Álvarez & Orallo, 2003; Camacho, 2019, p. 11).

Se caracterizan por su baja toxicidad, elevada actividad antioxidante, así como por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica al reducir radicales libres y quelar metales. Esto último se debe a la posibilidad que tienen de formar complejos con iones metálicos como el cobre (Cu^{2+}) y el hierro (Fe^{2+}) (S. Ordoñez et al., 2019, p. 176).

En las almendras se pueden distinguir tres grupos de flavonoides, que a su vez son una subclase de polifenoles: catequinas o flavan-3-oles (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%). En el primer grupo, los principales flavan-3-oles del cacao son la (+)-catequina y (-)-epicatequina; siendo esta última la más abundante de los polifenoles totales. El segundo grupo está formado por antocianinas, las cuales son pigmentos hidrosolubles que desaparecen rápidamente, debido a que se hidrolizan a antocianidinas y azúcares durante la fermentación; esto se evidencia con la pérdida del color púrpura de las almendras. A continuación, las antocianidinas son polimerizadas en catequinas para formar taninos condensados (o proantocianidinas) durante la fermentación. El tercer grupo lo constituye un tipo de proantocianidina, llamado procianidina, el cual está formado por dímeros (B1, B2, B3, B4 y B5), trímeros condensados (C1), oligómeros o polímeros superiores constituidos por flavan-3-oles (Afoakwa, 2014, p. 289; Camino, 2014, pp. 26–29; Gbogbri, 2020, p. 39; Paniagua, 2015, p. 17; Perea, 2019, p. 36; Samaniego, 2020, pp. 27–32).

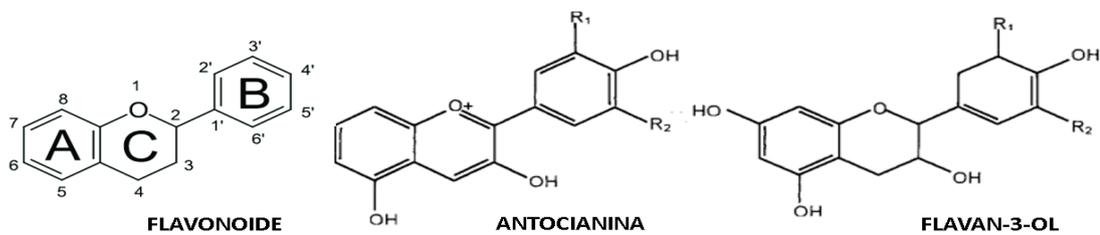


Figura 1-1. Estructura química de flavonoides, antocianinas y flavan-3-oles

Fuente: Steinberg et al., 2003, p. 218.

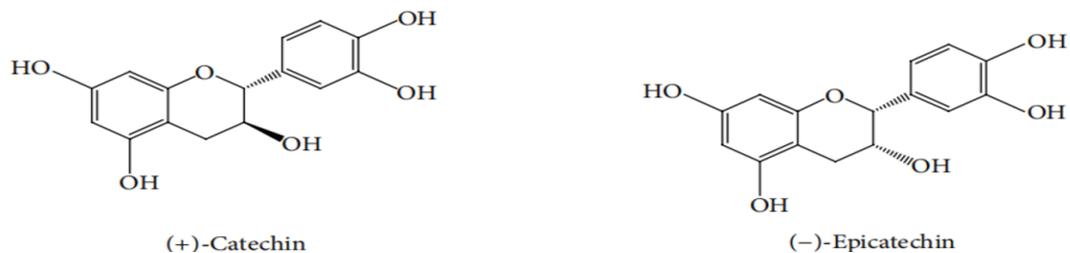


Figura 2-1. Estructura química de flavan-3-oles de cacao: (+)-catequina y (-)-epicatequina

Fuente: Paniagua, 2015, p. 18.

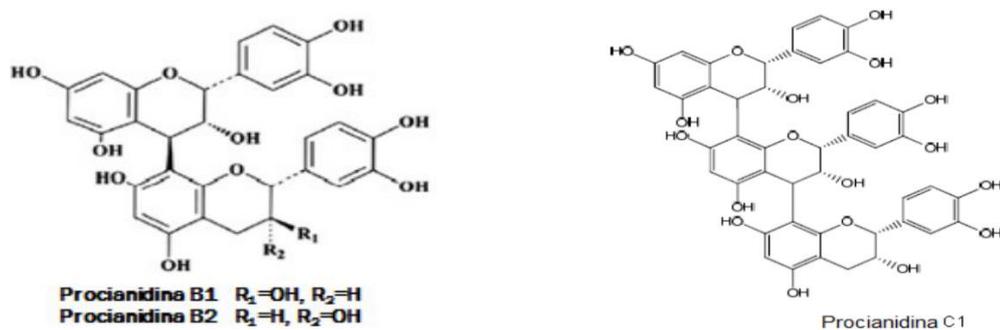


Figura 3-1. Estructura química de algunas procianidinas presentes en el cacao

Fuente: Paniagua, 2015, p. 18; Perea, 2019, p. 36.

1.2.5.3. *Actividad antioxidante*

La actividad antioxidante es la capacidad que tienen ciertos compuestos químicos, conocidos como antioxidantes (donadores de electrones), de impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias (principalmente de los ácidos grasos), dado que estabilizan electroquímicamente a los radicales libres (moléculas o grupos de moléculas muy reactivas que tienen un electrón desapareado), evitando así causar daños a la salud.

Si bien los radicales libres se forman naturalmente en el cuerpo y tienen una función importante en muchos procesos naturales de las células, en caso de encontrarse en altas concentraciones pueden ser muy peligrosos y causar daño a los componentes principales de la célula, incluso el ADN. Los antioxidantes, en cambio, son sustancias bioactivas de distinta naturaleza química (como los compuestos fenólicos), que se encuentran de forma natural en las plantas. Su presencia en los alimentos es fundamental, no sólo porque activan sus propiedades organolépticas naturales, y los preserva; sino que incluso, al ser ingeridos pueden limitar el estrés oxidativo que participa en el envejecimiento y desarrollo de diferentes patologías. Además, el consumo de antioxidantes es conveniente por sus efectos analgésicos, anticancerígenos, vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios, inmunitarios y por su actividad antimutagénica (Cofré, 2015, pp. 4–9; Morales, 2017, p. 17; Palma, 2018; Portillo, 2017, p. 4; Rivas et al., 2017, p. 3).

Una de las plantas que ha despertado interés en la industria alimenticia y cosmética, es el *Theobroma cacao L.*, debido al alto contenido en polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos, que proporcionan a los granos de cacao una gran capacidad antioxidante comparado a otros alimentos como el té, el vino rojo o la vitamina E y C (Delgado et al., 2018, p. 543; Gbogbri, 2020, p. 39; Omar et al., 2015, p. 1264; Vázquez et al., 2016, p. 244).

1.2.5.4. *Alcaloides*

La Teobromina (3-7- dimetilxantina) y Cafeína (1-3-7-trimetilxantina), son metilxantinas que representan más del 99% de los alcaloides del grano. Se ligan a los taninos para formar compuestos complejos relacionados con el sabor del cacao. Estas metilxantinas son moléculas psicofarmacológicamente activas, que estimulan el sistema nervioso central; pero al encontrarse en bajas concentraciones en el cacao y al ser una parte pequeña de la dieta, no constituyen un riesgo para la salud, sino que más bien, actúan como agentes antitumorales, antiinflamatorios, etc. La determinación de estos alcaloides permite establecer la relación Teobromina/Cafeína, que al ser un parámetro medible posibilita la diferenciación de cacaos por su origen. Es decir, se establece una relación entre el material genético y el contenido de metilxantinas (Espín & Samaniego, 2016, p. 44; Perea, 2019, p. 38; Samaniego, 2020, pp. 24–25).



Figura 4-1. Estructura química de las metilxantinas. Teobromina (A) y Cafeína (B)

Fuente: Samaniego, 2020, p. 21.

Los sabores principales del grano de cacao se producen por los diferentes compuestos que este tiene. Por un lado, la astringencia se debe a la presencia los polifenoles, mientras que la amargura es causada por la sinergia de las reacciones que ocurren entre la teobromina, cafeína, y las dicetopeperazinas (Espín & Samaniego, 2016, p. 24).

1.2.6. Tratamiento postcosecha o beneficio

Es el conjunto de prácticas que conduce a la transformación bioquímica de las almendras de cacao una vez que son recolectadas. Dichas transformaciones permiten la expresión del potencial de calidad en cuanto a color, sabor y aroma. Este tratamiento comprende la fermentación y el secado de los granos de cacao, que pasan posteriormente a procesos industriales como el tostado (Lares et al., 2013, pp. 2–3; Perea, 2019, p. 55).

1.2.6.1. Fermentado

ocurridos durante este proceso (especialmente en el pH y la temperatura de la masa fermentable) junto a las reacciones bioquímicas y enzimáticas, modifican la composición química del grano, por ende, las características organolépticas y funcionales del mismo. De esta manera, se contribuye a la generación de importantes moléculas precursoras de sabor y aroma como el 2-metilbutanoato de etilo, ciertas pirazinas, entre otras (Edem et al., 2016, p. 2; Perea, 2019, p. 58).

Las modificaciones en la composición de la almendra que ocurren durante la fermentación se dan principalmente en las proteínas, azúcares, polifenoles y alcaloides. Si bien los cambios químicos son bastante complejos; y aún no se aclaran por completo a pesar de años de estudio, se pueden diferenciar tres fases principales (Perea, 2019, p. 74; Samaniego, 2020, pp. 30–33). La primera fase consiste en la fermentación alcohólica, en la que los azúcares (glucosa y fructosa) se convierten en etanol por la acción de levaduras anaeróbicas. En la segunda fase, ocurre la fermentación acética; en la que se oxida el etanol y se transforma en ácido acético por la acción de bacterias en condiciones aeróbicas. En la tercera fase, se producen dos reacciones bioquímicas clave: la primera es la hidrólisis de proteínas que conduce a la formación de aminoácidos y péptidos precursores del aroma y sabor (Afoakwa et al., 2008); la segunda es la condensación oxidativa de los

polifenoles (incluidas catequinas, procianidinas, antocianidinas, etc) que disminuye la astringencia del grano, debido a que estos forman complejos de alto peso molecular como los taninos; que provocan el cambio de coloración violeta al marrón característico de almendras bien fermentadas (Pérez, 2017, pp. 21–23).

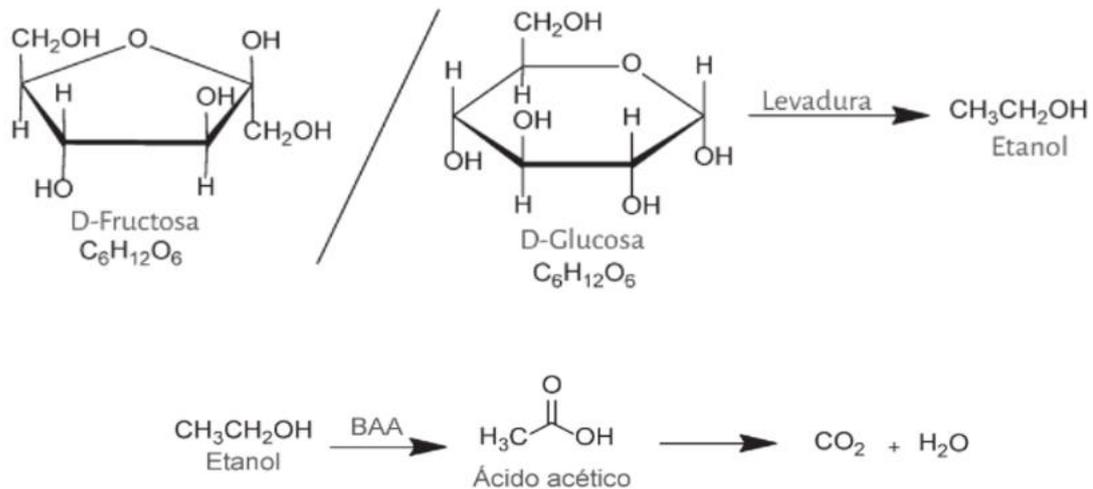


Figura 5-1. Fermentación alcohólica y fermentación acética en las almendras de cacao durante el proceso beneficio o postcosecha

Fuente: Perea, 2019, pp. 62–64.

Después de la etapa de fermentación, los granos de cacao contienen esencialmente grasa, compuestos polifenólicos y proteínas (Clímaco, 2008, p. 40).

El contenido de grasa y su composición en ácidos grasos y triacilglicéridos aumenta ligeramente; debido a que la muerte del embrión provoca la pérdida de la estructura celular; favoreciendo de esta manera la liberación de la manteca de cacao (Camino, 2014, p. 25; Perea, 2019, pp. 74–75). Los alcaloides no revelan transformaciones químicas durante la fermentación, pero si sufren una pérdida de alrededor del 20-30% en almendras bien fermentadas; lo que contribuye en la disminución del amargor (Samaniego, 2020, p. 23). Adicionalmente, se forman metabolitos secundarios que contribuyen a la fracción volátil, la cual tiene gran participación en el sabor y aroma del cacao (Perea, 2019, pp. 58–74; Pérez, 2017, pp. 21–23; Samaniego, 2020, pp. 30–33; Vázquez et al., 2016, p. 242).

El tiempo de fermentación debe controlarse cuidadosamente, ya que si es muy largo se producen almendras sobre fermentadas, que se caracterizan por presentar una acidez excesiva y sabores indeseables (sabores a humedad o a basura). Por el contrario, cuando las almendras no se someten a este proceso o está realizado de forma deficiente, se produce el llamado “cacao corriente”, que se caracteriza por su fuerte astringencia y ausencia de aroma. En general, una fermentación óptima dura de 2 a 3 días cuando se trata de almendras de cacao Criollo, de 5 a 7 días para cacaos Forastero y 4 días para el cacao Nacional, aunque puede variar en función del volumen, la

temperatura, la región de producción, la flora microbiana, la aireación, el tipo de fermentador, el método utilizado y el material genético (Clímaco, 2008, p. 30; Rodríguez, 2019, p. 31; Wakao, 2002, pp. 12–13).

La fermentación se puede realizar de diferentes formas, dependiendo del desarrollo tecnológico del centro de investigación o de la experiencia técnica- investigativa del agricultor. Los métodos más comunes en Ecuador son: cajas de madera, sacos de cabuya, montones (almendras amontonadas en suelo de madera), y gavetas Rohan (sistema de máximo 12 gavetas colocadas en pila). Todos estos procesos de fermentación tienen como principio crear un ambiente semicerrado, que elimine el líquido de exudación de las almendras y que estas alcancen 45°C para inducir la muerte del embrión e iniciar el proceso químico de transformación (Samaniego, 2020, pp. 33–34).

1.2.6.2. Secado

Es un proceso físico que consiste en disminuir la humedad de los granos de cacao, para evitar la proliferación de hongos durante el almacenamiento (generan sabores desagradables) así como, la producción de toxinas (sustancias venenosas o tóxicas). La actividad enzimática que ocurre en la almendra durante este proceso es importante para reducir la astringencia y amargor que posee. Por esta razón, los valores de humedad se reducen del 60% al rango de 6 u 8%, que es altamente deseable (Vázquez et al., 2016, p. 11).

Se pueden utilizar varias técnicas para secar el cacao como: el soplado al aire, secado al sol, secado a la sombra y secado al horno. El uso de cualquiera de estos métodos puede tener efecto sobre las características sensoriales del producto final. En este sentido, el uso del secado artificial puede aumentar la temperatura de los cotiledones provocando un endurecimiento en la cubierta del grano, y restringir la pérdida de ácidos volátiles con efectos perjudiciales sobre el sabor final (Afoakwa et al., 2008, pp. 7–8). En cambio, se ha reportado que el contenido de alcoholes, ésteres y pirazinas, se ve aumentado durante el proceso de secado al sol, mientras que la concentración de ácidos, aldehídos y cetonas se ven disminuidos, lo cual coloca el secado al sol como el mejor método para obtener el máximo sabor (Rodríguez et al., 2011; Rodríguez et al., 2012; Vázquez et al., 2016, p. 12).

1.2.7. Calidad del grano de cacao

La calidad del grano es un concepto abstracto, que cubre aspectos como el sabor, la conservación y la aceptabilidad que le dan los países compradores y fabricantes de chocolate (G.A.R Wood & R.A Lass, 2008, p. 480). Para tener almendras de cacao bien secas, de color marrón adecuado y sin sabores u olores extraños (Afoakwa et al., 2008) se toman como parámetros de calidad el aspecto físico y las propiedades organolépticas de la almendra.

1.2.7.1. Calidad física

Consiste en la calificación que se da a los granos de cacao fermentados y secos, de acuerdo a su apariencia externa, que no necesariamente coincide con un buen sabor y aroma (Sánchez, 2007, p. 8). Este parámetro se determina por el cumplimiento adecuado de las prácticas de cultivo y postcosecha. Los indicadores para evaluar la calidad física son el peso, el tamaño, el número y color de los granos, la condición interna de los cotiledones, el índice de fermentación (medida indirecta del contenido de antocianinas), los daños evidentes por hongos o insectos, entre otros (Edem et al., 2016, p. 6).

1.2.7.2. Calidad organoléptica

En el caso del cacao y sus productos derivados, tanto el aroma como el sabor dependen del origen genético, las condiciones de cultivo, las características del suelo, el clima, la edad de la plantación, el estado de madurez, la actividad enzimática, la cantidad y el tipo de precursores químicos, así como el subsecuente procesamiento del grano (Afoakwa et al., 2008, p. 5; Samaniego, 2020, p. 35; Verdesoto, 2009, p. 38).

Si bien el sabor y aroma están relacionados, los compuestos responsables en cada caso tienen propiedades físicas y químicas diferentes. Las sustancias responsables del sabor, son de mayor peso molecular, no volátiles y solubles en agua. Por otro lado, y en un menor número tenemos a las sustancias relacionadas con el aroma, que forzosamente han de ser volátiles para que lleguen a los centros olfativos (Cuñat, 2016, p. 11).

1.2.8. Calidad de los granos de cacao según la normativa ISO e INEN

La descripción de propiedades como el gusto (sabor), olor, color (aspecto), textura, etc., implican apreciaciones cualitativas (evaluaciones sensoriales) y cuantitativas (análisis físicos) (Cuñat, 2016, p. 1). Estas apreciaciones son utilizadas por diferentes institutos u organizaciones de normalización, para evaluar la calidad de los diferentes granos de cacao.

1.2.8.1. ISO 2451:2017 “Granos de cacao-especificaciones y requisitos de calidad”

La normativa internacional establece diferentes metodologías para la evaluación de la calidad del grano de cacao, entre estas tenemos: el muestreo, los métodos de ensayo, envasado y marcado de las almendras de cacao. De igual manera, cubre aspectos como el tamaño, el color, el contenido de humedad, la preparación, la clasificación de las almendras, e incluso hace recomendaciones

sobre el almacenamiento y desinfección de los mismos (Internacional Organization for Standardization, 2017; Servicio de Acreditación Ecuatoriano, 2018).

1.2.8.2. NTE INEN 176:2018 Quinta revisión “Granos de cacao. Requisitos”

La normativa nacional, además de especificar los requisitos de calidad para los granos de cacao beneficiado, establece los criterios para su clasificación (INEN 176, 2018, p. 2). La norma técnica ecuatoriana utiliza parámetros físicos (porcentaje de humedad, nivel de fermentación, entre otros), y pruebas organolépticas, con el fin de evaluar la calidad del grano de cacao y asegurar que esté libre de sabores u olores a moho, humo, ácido butírico (podrido), agroquímicos o cualquier otro parámetro, que pueda considerarse objetable (Samaniego, 2020, p. 102).

Tabla 2-1: Requisitos físicos y de calidad para los granos de cacao

Requisitos	Cacao			Cacao CCN 51		Método de ensayo
	A.S.S.S	A.S.S	A.S.E	C.S.S	C.S.C	
Humedad, máximo %	7	7	7	7	7	NTE INEN-ISO 2291
Peso de 100 granos, g	>130	>120 a 130	>100 a 120	>125	110-125	^a
Granos fermentados, mínimo, %	75	65	53	68	55	NTE INEN-ISO 1114
Granos violetas máximo, %	15	21	25	18	26	NTE INEN-ISO 1114
Granos pizarrosos máximo, %	9	12	18	12	15	NTE INEN-ISO 1114
Granos mohosos, máximos, %	1	2	4	2	4	NTE INEN-ISO 1114
TOTALES (análisis sobre 100 granos), mínimo	100	100	100	100	100	
Granos defectuosos máximo, %	0	1	3	1	3	^b
Material relacionado al cacao, máximo, %	1	1	1	1	1	^b
Material extraño, máximo, %	0	0	0	0	0	^b
A.S.S.S Arriba Superior Summer Selecto; A.S.S. Arriba Superior Selecto; A.S.E. Arriba superior Época; C.S.S. Cacao Superior Selecto; C.S.C. Cacao Superior Corriente * El símbolo % (por ciento) representa al número 0,01, que expresa a la fracción másica. ^a Masa determinada por medio de una balanza u otro instrumento equivalente. ^b Determinado en 500 g de muestra						

Fuente: INEN 176, 2018, p. 4.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

1.2.9. Fundamento de los métodos y técnicas de análisis

1.2.9.1. Método de extracción Soxhlet

Es el método estándar más utilizado en la extracción de muestras sólidas; y sirve como método de referencia con el que se comparan otros procesos de extracción. Esta metodología consiste en colocar una muestra sólida finamente pulverizada en un cartucho situado en la cámara del extractor. Se calienta el disolvente extractante situado en el balón, se condensan sus vapores que caen gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra, obteniendo así los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente con los analitos disueltos asciende por el sifón y retorna al balón de ebullición. El proceso se repite hasta completar la extracción de los analitos de la muestra (Arroyo, 2005, pp. 1–2). Este método se emplea comúnmente como un proceso de desengrase del cacao, debido a que el alto contenido de grasa en los granos (más del 50% en base seca) constituye una barrera para la liberación de los compuestos fenólicos de las células. Durante el proceso se utilizan solventes apolares como el hexano o el éter de petróleo, que permiten que el contenido de grasa final sea inferior al 12% en peso (Toro et al., 2020, p. 2).

1.2.9.2. HPLC

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), es la técnica analítica que permite separar los componentes de una mezcla orgánica, cuando éstos son poco volátiles, iónicos, termolábiles y tienen pesos moleculares relativamente altos. El proceso de separación y purificación consiste en que la fase móvil transporta la muestra a través de la fase estacionaria (columna de separación), donde los componentes se disocian en función de las interacciones fisicoquímicas. Estos componentes son captados por el detector de acuerdo a la absorción de la luz, los cambios del índice de refracción, las variaciones electroquímicas/de conductividad, o simplemente por la distribución del tamaño de las moléculas que eluyen. La respuesta del detector se produce en forma de picos con un área directamente proporcional a la cantidad presente. La técnica contribuye en el mejoramiento del control de calidad de los alimentos, productos farmacéuticos, etc (Miranda & Martín, 2017, p. 1; Ruíz, 2020, p. 2).

1.2.9.3. Espectrofotometría UV-Vis

La técnica analítica permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380-780nm. La

radiación absorbida por las moléculas provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas (Abril et al., 2018, p. 1). Se emplea en la determinación cuantitativa de compuestos altamente conjugados, polifenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante.

1.2.9.4. Método de Folin Ciocalteu

Se utiliza para medir el contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Este método se basa en una reacción redox, en la que el reactivo de Folin- Ciocalteu es reducido al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, dando lugar a un complejo de color azul ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$) que presenta un máximo de absorción a 760nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Teniendo en cuenta que la intensidad de color azul es proporcional al contenido de compuestos fenólicos (García et al., 2018, p. 5; Pedan, 2017, p. 34).

El reactivo Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo, que está formado por dos sales (wolframato sódico y molibdato sódico) en medio ácido (ácido fosfórico). Este ensayo se emplea en el análisis de polifenoles totales y en el estudio de las propiedades antioxidantes tanto en alimentos vegetales como en zumos de fruta, debido a que este parámetro generalmente muestra una estrecha correlación con los diferentes métodos de medición de la actividad antioxidante (García et al., 2018, pp. 5–6).

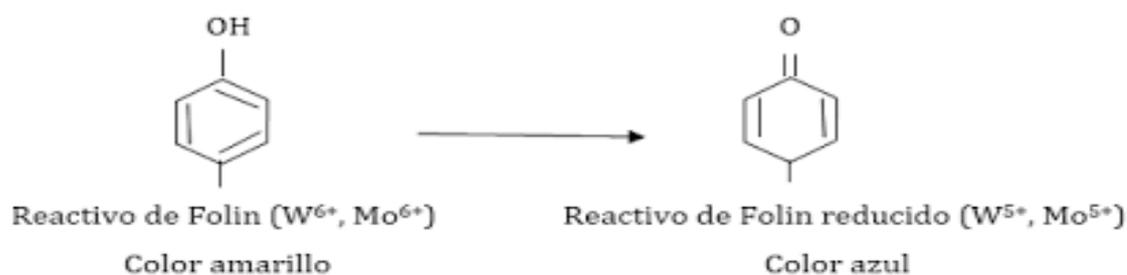


Figura 6-1. Oxidación de polifenoles en ensayo de Folin-Ciocalteu. Procedimiento basado en la transferencia de electrones en un entorno básico, mediante sustancias reductoras

Fuente: Pedan, 2017, p. 34.

Cuanto mayor sea el número de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos, mayor será la reactividad. La desventaja de este método es que además de los polifenoles, también hay otros compuestos con grupos hidroxilo, como por ejemplo, los azúcares reductores o las proteínas (Pedan, 2017, p. 35).

1.2.9.5. Determinación de flavonoides por el método de tricloruro de aluminio

Recientemente se han utilizado métodos espectrofotométricos para determinar flavonoides totales empleando tricloruro de aluminio, por ser un método exacto (reproducible) que tiene desviaciones pequeñas o nulas entre una prueba y otra, sobre la misma muestra.

El catión aluminio junto a los flavonoides, forman complejos estables de color rosa en medio básico. Es posible determinar la cantidad de estos compuestos, debido a que, en el análisis espectrofotométrico, se produce un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. De esta manera se evita interferencias con otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales (Amaya & Portillo, 2013, p. 53).

Como se muestra en la Figura 7-1 se utiliza nitrito de sodio (NaNO_2) para producir la oxidación de los grupos hidroxilo del anillo B de la catequina (un tipo de flavonoide) y generar ácido nitroso (HNO_2), que junto al cloruro de aluminio (AlCl_3) forma un complejo amarillo, que al agregarle hidróxido de sodio (NaOH) produce el complejo de color rosa (Camacho, 2019, p. 16).

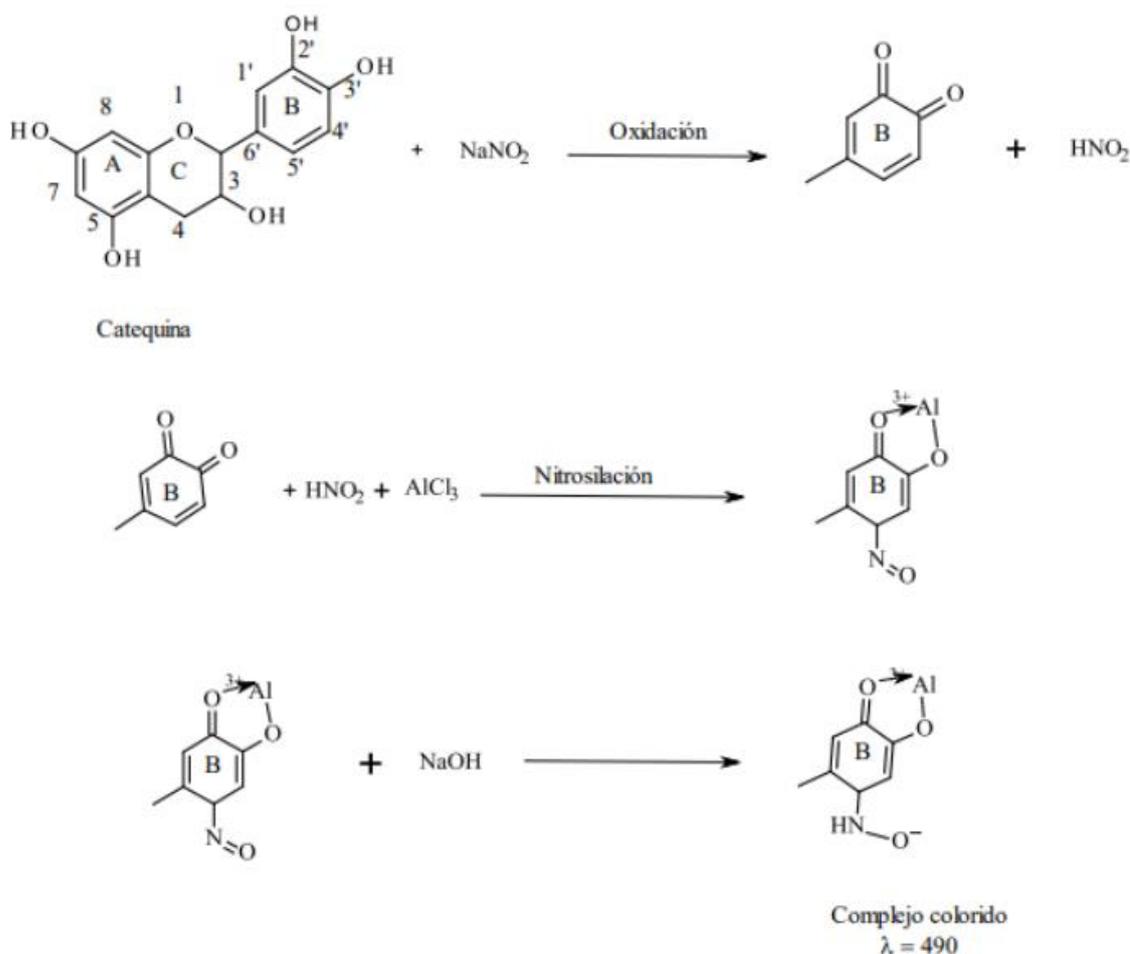


Figura 7-1. Formación del complejo de aluminio-flavonoide en medio básico

Fuente: Camacho, 2019, p. 16.

1.2.9.6. Método de capacidad antioxidante (ABTS y FRAP)

- **Método ABTS**

Es un método espectrofotométrico que se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical catiónico ABTS⁺ (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfónico)), el cual es un cromóforo verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm. Al reaccionar el ABTS⁺ con compuestos fenólicos (antioxidantes) genera la formación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) y la oxidación de los compuestos fenólicos, lo que provoca la pérdida de coloración y por tanto la disminución de la absorbancia; que como porcentaje de inhibición del radical está determinado en función de la concentración (Amaya & Portillo, 2013, p. 55; Rioja et al., 2018, p. 172). Es decir, la reducción en la medida de la absorbancia permite conocer la capacidad antioxidante de una muestra en cuestión. De forma que, a mayor capacidad antioxidante, mayor es la decoloración generada sobre el ABTS⁺.

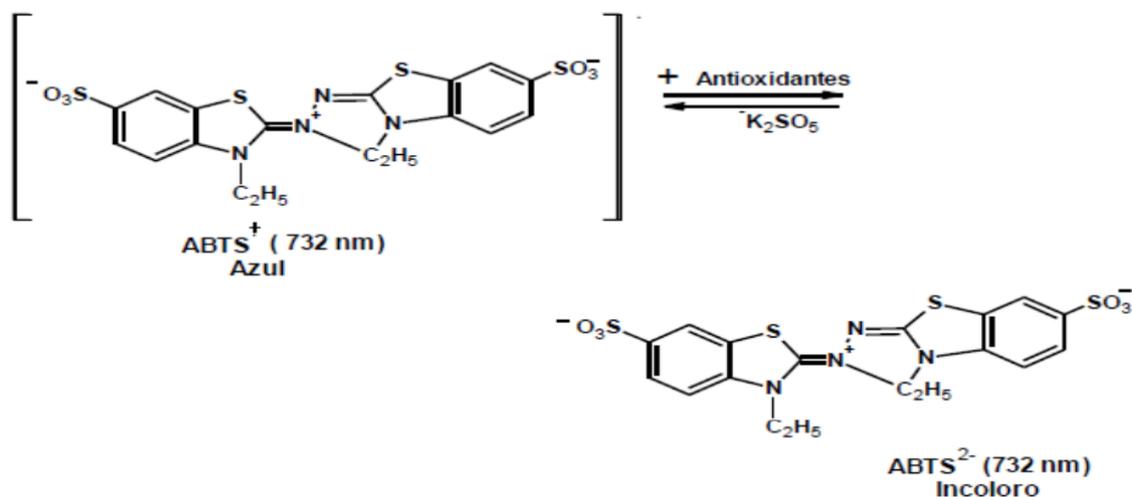


Figura 8-1. Estructura del ABTS⁺ antes y después de la reacción con el antioxidante. En orden inverso, se forma el radical ABTS con un oxidante fuerte (persulfato de potasio)

Fuente: Sánchez, 2018, p. 5.

- **Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Es un método espectrofotométrico que consiste en evaluar la actividad antioxidante de una muestra, de acuerdo a su capacidad para reducir el catión Fe³⁺ presente en el reactivo de FRAP (Fe³⁺-TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina)) hasta su forma Fe²⁺ (Ortiz et al., 2019, p. 44; Zapata et al., 2013, p. 395). El complejo ferroso formado (Fe²⁺-TPTZ) tiene una coloración azul verdosa intensa, en presencia de antioxidantes en un medio ácido. Dicha intensidad es proporcional a la capacidad reductora de la muestra que puede cuantificarse por colorimetría (593nm) en base a un patrón de

sulfato ferroso (Rioja et al., 2018, p. 5). En este caso, es el aumento de la absorbancia lo que permite conocer la capacidad antioxidante de una muestra.

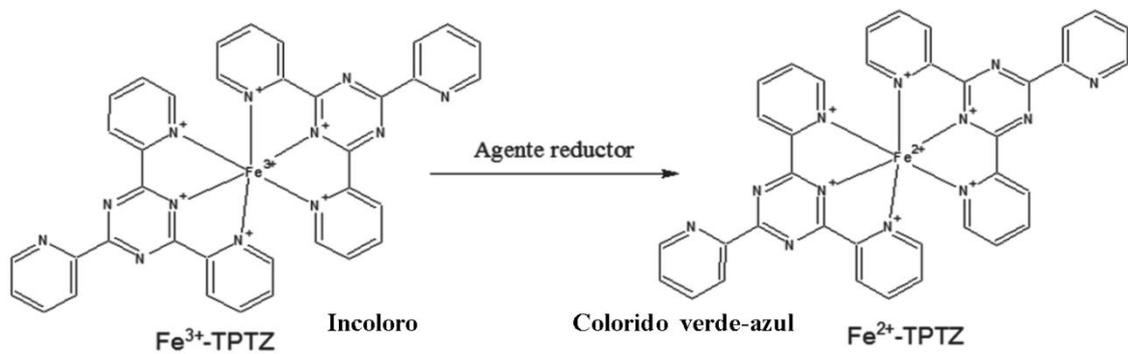


Figura 9-1. Fundamento del método FRAP, mostrando la reducción del 2,4,6-tripiridil-triazina férrica (TPTZ)

Fuente: Londoño, 2017, p. 152.

1.2.10. Análisis estadístico

1.2.10.1. ANOVA para diseño factorial de 2 factores

El análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, es una prueba estadística que permite estudiar simultáneamente el efecto de dos fuentes de variación sobre una variable respuesta (Gutiérrez & De la Vara, 2008, p. 129; Traders.Studio, 2021).

Tabla 3-1: Tabla del análisis de varianza (ANOVA) para diseño bifactorial

FV	SC	GL	CM	Fo	Valor -p
Efecto A	SC _A	a-1	CM _A	CM _A / CM _E	$P(F > F_0^A)$
Efecto B	SC _B	b-1	CM _B	CM _B / CM _E	$P(F > F_0^B)$
Efecto AB	SC _{AB}	(a-1) (b-1)	CM _{AB}	CM _{AB} / CM _E	$P(F > F_0^{AB})$
Error	SC _E	ab(n-1)	CM _E		
Total	SC _T	abn-1	CM _T		

FV: Fuente de variabilidad (efecto); SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: media cuadrática; Fo: estadístico de prueba; valor -p: significancia observada.

Fuente: Gutiérrez & De la Vara, 2008, p. 136.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

1.2.10.2. Prueba de Tukey

El método de Tukey se emplea en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias entre las medias de los niveles de los factores, mientras controla la tasa de error por

familia en un nivel específico. Consiste en comparar las diferencias entre medias muestrales con el valor crítico dado (Minitab 18, 2019).

1.2.10.3. Análisis de componentes principales (ACP)

El método estadístico de carácter multivariante, tiene por objeto transformar las variables originales de un conjunto de datos medidos de una población en un menor número de variables (componentes principales (CP)) que se expresan como una combinación lineal de las variables originales y se van formando de acuerdo a la mayor de variabilidad de la matriz de datos, además son independientes entre sí. Para lo cual, se obtiene una nueva variable compuesta, que sustituye a todas las variables originales y tiene la máxima correlación con las mismas, para facilitar la interpretación de datos (Camacho, 2019, p. 38).

Los resultados se representaron en gráficas bidimensionales, donde los tratamientos se ubicaron como puntos de dispersión en el plano y las variables estudiadas como vectores, donde el ángulo entre ellos equivale al grado de correlación entre las variables (Camacho, 2019, p. 38).

1.3. Bases conceptuales

1.3.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa que puede producir radicales libres y reacciones en cadena que pueden dañar las células de un organismo (Londoño, 2017, p. 1). Los antioxidantes son los polifenoles y flavonoides.

1.3.2. Alcaloides

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas de carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Se forman a partir de aminoácidos, tienen una estructura compleja, son tóxicos y tienen actividad fisiológica incluso a dosis muy bajas. Sin embargo, también hay excepciones a estas características generales (Kukilnski, 2000, p. 167).

1.3.3. Amargo

Sabor elemental provocado por soluciones acuosas diluidas de diversas sustancias, tales como la quinina y otros alcaloides como la cafeína (Kukilnski, 2000, p. 167).

1.3.4. *Astringencia*

Fenómeno gustativo relacionado con sensaciones táctiles percibidas en forma de sequedad en la boca junto con una agresiva contracción, irritación o arrugamiento. La astringencia usualmente se debe a la asociación de diversos compuestos fenólicos (Artajo, 2020).

1.3.5. *Cafeína*

La cafeína es un alcaloide (1,3,7- trimetilxantina) que mejora el rendimiento físico e intelectual, mitiga la fatiga y provoca una sensación de alerta, es decir, estimula el sistema nervioso central. Se obtiene de las semillas del café, té y entre otros vegetales el cacao (Perea, 2019, p. 156; Samaniego, 2020, p. 23).

1.3.6. *Calidad*

La calidad es el grado en el que un conjunto de características inherentes a un objeto (producto, servicio, proceso, organización, sistema o recurso) cumple con los requisitos (Internacional Organization for Standardization, 2015).

1.3.7. *Componentes bioactivos*

Componentes naturales de los alimentos de origen animal o vegetal que influyen en la actividad celular y en mecanismos fisiológicos, con efectos beneficiosos para la salud. Entre los componentes bioactivos se encuentran los fenólicos (como los flavonoides) y las metilxantinas (Carbajal, 2019, pp. 1–2; Martínez, 2014, p. 49).

1.3.8. *Compuestos no volátiles*

Son aquellos que no se evaporan fácilmente en forma de gas en condiciones ambientales o de evaporación. Los compuestos no volátiles presentan una baja presión de vapor y un alto punto de ebullición (Perone, 2018).

1.3.9. *Fermentación*

La fermentación es un proceso microbiológico y bioquímico que conduce a la eliminación de la pulpa o mucílago, provoca la muerte del embrión, activa las reacciones bioquímicas en el interior

de los cotiledones e intensifica el desarrollo de los precursores del sabor y aroma (Instituto de Química Aplicada, 2018).

1.3.10. Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo-[gamma]-pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos (Cartaya & Reynaldo, 2001).

1.3.11. Metilxantinas

Son un grupo de alcaloides vegetales, como la teobromina (dimentilxantina) y cafeína (trimetilxantina), cuyos efectos no son tan fuertes como los de la cocaína o anfetaminas, pero estimulan el sistema nervioso central. En dosis moderadas producen una mejora del rendimiento mental y físico y reducen el cansancio y el sueño. Dosis altas pueden producir ansiedad y disforia, así como trastornos del sueño (Moratalla, 2008, p. 202).

1.3.12. Polifenoles

Los polifenoles son una gran familia de compuestos orgánicos de origen natural caracterizados por sus múltiples de unidades de fenol. Son abundantes en las plantas y estructuralmente diversos. (Quideau et al., 2011).

1.3.13. Teobromina

Es el principal compuesto químico alcaloide, presente de forma natural en el cacao y otros alimentos. Pertenece a la familia de las metilxantinas y tiene un efecto estimulante del sistema nervioso y diurético debido a que son antagonistas de los receptores de adenosina (Alvarez, 2017; Flores, 2017).

1.3.14. Variedad clonal

Un Clon de cacao es un material genético uniforme derivado de un individuo y propagado por medios vegetativos (Lucero, 2014, p. 27).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación

2.1.1. *Por el método de investigación*

La investigación tiene un enfoque cuantitativo, pues la calidad del cacao depende de la concentración de los principales CQNV presentes en el grano. Por ello se determinó el contenido de grasa, compuestos fenólicos y alcaloides, además de la actividad antioxidante en 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano. Esto se realizó mediante métodos cuantitativos como la espectrofotometría y cromatografía, que permitieron la agrupación de datos para realizar un análisis estadístico que permitiera demostrar la hipótesis de esta investigación.

2.1.2. *Según el objetivo*

El estudio es aplicado, porque se adoptaron procesos y técnicas preestablecidas que, junto al conocimiento adquirido sobre la química instrumental, permitieron cuantificar los diferentes CQNV ecuatoriano que están asociados a la calidad del mismo.

2.1.3. *Según el nivel de profundidad en el objeto de estudio*

El trabajo está enmarcado en el nivel explicativo, ya que buscó determinar el porqué de los hechos (datos experimentales) mediante relaciones de causa-efecto. Es decir, se analizó el efecto que tiene la fermentación y el secado sobre la actividad antioxidante y el contenido de CQNV, que están asociados a la calidad organoléptica de 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano, para de esta forma someter a prueba la hipótesis planteada y así llegar a resultados y conclusiones que contribuyan a un nivel más profundo de conocimiento.

2.1.4. *Según la manipulación de variables*

La investigación es experimental, ya que se pudo evaluar el nivel de fermentación (variable independiente) de las almendras de cacao ecuatoriano en estudio, para observar su efecto en el contenido de principales CQNV (variable dependiente). Esto se llevó a cabo en condiciones controladas, con el fin de describir el modo en que la fermentación aumenta o disminuye el contenido de CQNV según el tipo de material seleccionado de cacao ecuatoriano.

2.1.5. Según el tipo de inferencia

El trabajo es deductivo, ya que, en base al análisis del contenido de CQNV, hallados en las diferentes variedades de cacao ecuatoriano, se determinó el efecto que tiene la fermentación y el secado en cada uno de los materiales seleccionados.

2.1.6. Según el periodo temporal

El trabajo es de tipo transversal, porque se recopiló información de las diferentes muestras de cacao clonado ecuatoriano de forma rápida y en un momento específico.

2.1.7. Por el lugar de estudio

La presente investigación forma parte del proyecto “Estudio de la expresión y diversidad genética para la determinación de la calidad en clones de cacao nacional centenario del Ecuador”. Este proyecto se encuentra a cargo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP); por ello, la investigación se realizó en los laboratorios de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos (LSAIA), en el Área de I&D de Procesos y Productos 1 del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP. Las muestras se analizaron en el laboratorio dado el requerimiento de equipos, materiales y reactivos específicos.

2.2. Diseño de la investigación

En el trabajo de investigación, se pretendió evaluar el efecto de la fermentación y el secado sobre el contenido de CQNV, y a su vez diferenciar la concentración de estos compuestos bioquímicos en los 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano. Para ello, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial 6x2 con 2 repeticiones (Tabla 5-2); donde el primer factor fue el material seleccionado de cacao (EEB-8; ICS-95; EET-103; CCN-51; CCNC-037L; y CCNC-262M), y el segundo factor el nivel de fermentación (D₀: sin fermentar, D₄: fermentado por 4 días y D₄^{*} fermentado por 5 días).

En la Tabla 4-2 se observan los tratamientos en estudio y las respuestas experimentales, las cuales fueron datos cuantitativos del contenido de grasa, compuestos fenólicos, metilxantinas y la actividad antioxidante en almendras de cacao fermentadas y sin fermentar.

Respecto al análisis estadístico, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de 2 factores para determinar simultáneamente el efecto de las 2 fuentes de variación (material seleccionado de cacao y nivel de fermentación) sobre la variable respuesta (contenido de CQNV). En aquellos tratamientos que presentaron diferencias, se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), para crear

intervalos de confianza entre las medias de los niveles de los factores. Por último, se aplicó el análisis de componentes principales para evaluar de manera integral, las relaciones entre los principales CQNV de los genotipos de cacao ecuatoriano de acuerdo a su nivel de fermentación. En el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistics versión 25 y el software STATISTICA 10.0 para Windows (StatSoft, París, Francia).

Tabla 4-2: Diseño experimental para análisis de componentes químicos no volátiles de cacao ecuatoriano

MS	NF	Respuestas Experimentales											
		G	PT	FT	CAT	EPI	PC-B2	PC-C1	ABTS	FRAP	TBR	CAF	TBR/CAF
EEB-8	D ₀												
EEB-8	D ₄												
CCNC-262M	D ₀												
CCNC-262M	D ₄												
CCN-51	D ₀												
CCN-51	D ₄ *												
CCNC-037L	D ₀												
CCNC-037L	D ₄												
EET-103	D ₀												
EET-103	D ₄												
ICS-95	D ₀												
ICS-95	D ₄												

MS: Material Seleccionado de cacao; N.F: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar, D₄: Fermentado por 4 días y D₄*: Fermentado por 5 días. G: Grasa; PT: Polifenoles totales; FT: Flavonoides totales; CAT: Catequina; EPI: Epicatequina; PC-B2 y PC-C1: Procianidina B2 y C1; ABTS y FRAP: Actividad antioxidante; TBR y CAF: Teobromina y Cafeína (metilxantinas). Resultados expresados en base seca (BS).

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

Tabla 5-2: Diseño experimental completamente al azar en arreglo factorial 6 x 2 con 2 repeticiones

NF	D ₀	MS					
		EEB-8	CCNC-262M	CCN-51	CCNC-037L	EET-103	ICS-95
	D ₀	R1	R1	R1	R1	R1	R1
		R2	R2	R2	R2	R2	R2
	D ₄	R1	R1	R1*	R1	R1	R1
		R2	R2	R2*	R2	R2	R2

MS: Material Seleccionado de cacao; N.F: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar, D₄: Fermentado por 4 días; *: Fermentado por 5 días; R1 y R2: Repetición 1 y 2.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

2.3. Identificación de variables

Variable dependiente:

Contenido de los principales componentes químicos no volátiles.

Variables independientes:

Nivel de fermentación de los diferentes genotipos de cacao ecuatoriano.

2.4. Planteamiento de la hipótesis

H_a: Existen diferencias significativas en el contenido de principales componentes químicos no volátiles asociados a la calidad de seis materiales seleccionados de cacao ecuatoriano con distintos niveles de fermentación.

H_o: No existen diferencias significativas en el contenido de principales componentes químicos no volátiles asociados a la calidad de seis materiales seleccionados de cacao ecuatoriano con distintos niveles de fermentación.

Tabla 6-2: Operacionalización de variables

Variable dependiente	Conceptualización	Dimensiones	Categoría	Indicador	Método/Técnicas/Instrumentos
Contenido de los principales componentes químicos no volátiles.	Los compuestos no volátiles presentan una baja presión de vapor y un alto punto de ebullición, por lo que no se evaporan fácilmente en forma de gas en condiciones ambientales o de evaporación.	Contenido	Grasa	g de grasa/ 100g cacao	Método de extracción Soxhlet/ Balanza
			Polifenoles totales	mg de ácido gálico/ g cacao desengrasado en BS	Método de Folin Ciocalteu/ Espectrofotómetro UV-Vis
			Flavonoides totales	mg catequina/ g cacao desengrasado en BS	Método de tricloruro de aluminio/ Espectrofotómetro UV-Vis
			Flavan-3-oles, y Procianidinas (B2 y C1)	mg de polifenol/ g cacao desengrasado en BS	HPLC
			Capacidad antioxidante	μmol Trolox/ g cacao desengrasado en BS	Método ABTS o FRAP / Espectrofotómetro UV-Vis
			Alcaloides (Teobromina y Cafeína)	g alcaloide/ 100g cacao desengrasado en BS	HPLC
Variable Independiente	Conceptualización	Dimensiones	Categoría	Indicador	Método/Técnicas/Instrumentos
Nivel de fermentación de los diferentes genotipos de cacao ecuatoriano.	La fermentación es un proceso microbiológico y bioquímico que conduce a la eliminación de la pulpa, provoca la muerte del embrión, activa las reacciones bioquímicas e intensifica el desarrollo de los precursores del sabor y aroma del cacao.	Tiempo	Días de fermentación	Sin fermentar – secado	Secado al sol/ método gravimétrico/ Balanza
				Fermentado - secado	Fermentación en caja de madera y Secado al sol/ método gravimétrico/ Balanza

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

2.5. Localización del estudio

El estudio se realizó en los laboratorios de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, ubicada a 13 km. al sur de Quito en la Parroquia Cutuglahua, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha, a una temperatura promedio de 12.4°C, humedad relativa del 82%, con un promedio de precipitación anual de 132.4 mm y cuyas coordenadas geográficas son: 00° 22' S, 78° 33' W y 2.050 m.s.n.m.

2.6. Población de estudio

Las almendras de los materiales seleccionados de cacao ecuatoriano (EEB-8; ICS-95; EET-103; CCN-51; CCNC-037L; CCNC-262M) empleadas en este estudio han sido previamente fermentadas-secadas o solamente secadas (un total de 12 muestras). Todas las muestras provinieron de la colección de cacaos del INIAP de la Estación Experimental Litoral Sur, ubicada en el Km 26 Vía Durán-Tambo, al oeste de Guayaquil, Cantón Yaguachi, Guayas, a una altitud de 17 msnm, a una temperatura promedio de 24,6°C, humedad relativa del 83% y un promedio de precipitación anual de 1.398 mm.

Tabla 7-2: Tamaño de la muestra

No	MS	NF	masa (g)
1	EEB-8	D ₀	306,3
2	EEB-8	D ₄	310
3	CCNC-262M	D ₀	122
4	CCNC-262M	D ₄	254,7
5	CCN-51	D ₀	298,1
6	CCN-51	D ₄ *	380
7	CCNC-037 L	D ₀	161,8
8	CCNC-037 L	D ₄	232
9	EET-103	D ₀	221, 5
10	EET-103	D ₄	306
11	ICS-95	D ₀	313
12	ICS-95	D ₄	229

MS: material seleccionado de cacao; NF: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar; D₄: fermentado por 4 días; D₄*: fermentado por 5 días.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

2.7. Técnica de recolección de datos

Se empleó la observación directa, ya que se utilizaron técnicas espectroscópicas, cromatográficas y gravimétricas que permitieron registrar de manera sencilla los diferentes cambios y resultados que se produjeron durante la investigación.

2.8. Procedimiento

2.8.1. Primera etapa: pretratamiento de la muestra

2.8.1.1. Muestreo

La recolección y tratamiento de los 6 materiales seleccionados de cacao, se realizó por el personal técnico de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP. Una vez recolectados los frutos, estos se abrieron y se separaron los granos con mucílago de las mazorcas sanas. Posteriormente cada muestra se dividió en dos partes; la primera se sometió directamente a un proceso de secado natural al sol (muestra sin fermentar), la segunda se sometió a un proceso de fermentación y secado. Cada muestra se etiquetó según la variedad, el peso y nivel de fermentación, así la muestra secada se denominó D₀ (sin fermentar); la muestra fermentada-secada se denotó como D₄ (fermentado por 4 días) y D₄* (fermentado por 5 días).

2.8.1.2. Proceso de fermentación

Los granos de cada genotipo de cacao se sometieron a un proceso de microfermentación, en cajas de madera de laurel, durante 4 días para los genotipos de cacao “Nacional” y 5 días para el cacao CCN-51, con remociones de la masa cada 24 horas.

2.8.1.3. Secado

Las muestras de cada genotipo de cacao con fermentación y sin fermentación se colocaron en un tendal de cemento, donde se realizó un proceso de secado natural al sol hasta obtener granos con una humedad aproximada de 7%. Posteriormente, las muestras fueron enviadas a la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP para los correspondientes análisis químicos.

2.8.1.4. Almacenamiento de la muestra

Los cacaos de cada muestra se pelaron, congelaron (-20°C) e identificaron con el código de laboratorio correspondiente. Posteriormente, se molieron en un molino ultra-centrífugo Retsch ZM 200 y se tamizaron a un tamaño de partícula de 355µm, para asegurar una correcta homogenización para los posteriores análisis químicos (Espín & Samaniego, 2016, p. 13).

2.8.2. Segunda etapa: análisis de compuestos químicos no volátiles

2.8.2.1. Desengrasado de la muestra por el método Soxhlet

Se pesó 8g de cacao tamizado en un sobre de papel filtro, y un balón de destilación antes del desengrasado de los granos. Después, se colocó el sobre con la muestra en el equipo Soxhlet, donde se realizó la extracción de grasa con hexano durante 16 horas. Concluido este proceso, se pesó nuevamente el balón de destilación. Por último, se secó a temperatura ambiente el papel filtro que contuvo el cacao desengrasado y se conservó a -18°C (Espín & Samaniego, 2016, pp. 15–16).

2.8.2.2. Procedimientos específicos

- **Contenido de grasa (G)**

La determinación del contenido de grasa se realizó en el mismo proceso de desengrasado de la muestra por el método Soxhlet. Se tomó como referencia el método oficial de Association of Official Agricultural Chemists (1997), el método analítico #37 de la IOCCC (1996) adaptado a las condiciones de laboratorio por Zambrano et al., (2010, p. 2,3). El cálculo del porcentaje de grasa se realizó con la siguiente fórmula (Espín & Samaniego, 2016, pp. 33–34):

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_1 - P_2}{P} * 100$$

P₁ = peso del balón con grasa (g).

P₂ = Peso del balón vacío tarado(g).

P = Peso de la muestra (g).

- **Porcentaje de humedad (H)**

Se determinó la humedad en los granos de cacao, con la finalidad de cuantificar los principales CQNV en base seca (BS). Para ello se pesó polvo de cacao tamizado en recipientes de aluminio secos, que se introdujeron en una estufa a 105°C por 24 horas para registrar el peso final. El cálculo se realizó con la siguiente fórmula (Espín & Samaniego, 2016, pp. 21–22):

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_3} * 100$$

P₁ = peso del recipiente de aluminio con la muestra húmeda (g).

P₂ = peso del recipiente de aluminio con la muestra seca (g).

P₃ = Peso del recipiente de aluminio tarado (g).

- **Polifenoles totales (PT)**

La cuantificación de polifenoles totales se realizó por espectrofotometría UV-Vis, utilizando el método propuesto por Espín y Samaniego (2016, p. 36), que está basado en el método de Cross y Vicent (1982, pp. 109–114). Con este fin, se realizó la extracción de los componentes fenólicos del cacao desengrasado utilizando una solución acuosa de Metanol al 70% (extracto crudo, también utilizado en el análisis de flavonoides y actividad antioxidante). Luego se realizó una dilución del extracto crudo con agua bidestilada para obtener 1mL de extracto diluido, al que se adicionó 6mL de agua bidestilada, 1mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, y se dejó reposar por 3min. A continuación, se añadió 2mL de Carbonato de Sodio al 20% (w/v) y se calentó en baño maría a 40°C por 2min. Esta reacción formó un cromóforo azul, cuya absorbancia se midió a 760nm en el espectrofotómetro Shimadzu modelo 2600. La cuantificación se llevó a cabo por interpolación de la absorbancia de cada muestra sobre la curva de calibración realizada con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg de GAE por gramo de muestra seca. (Espín & Samaniego, 2016, pp. 35–38):

$$\frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{g cacao}} = \frac{a * V_t * F_d}{p}$$

a = concentración de ácido gálico obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L).

V_t = volumen total de extracto (0,1 L).

F_d = factor de dilución (10 o 20).

p = peso de la muestra (g).

- **Flavonoides totales (FT)**

La cuantificación de flavonoides se realizó por espectrofotometría UV-Vis, utilizando el método propuesto por Zhishen et al. (1999, pp. 555–559). Para ello, se tomó 1mL de extracto diluido de cacao (preparado a partir del extracto crudo obtenido en PT), se adicionó 4mL de agua bidestilada, se homogeneizó y agregó 0,3mL de Nitrito de Sodio al 5% (w/v) y 0,3mL de Cloruro de Aluminio al 10% (w/v), se dejó reposar la muestra durante 5min después de la adición de cada reactivo. Finalmente se añadió 2mL de NaOH 1N y se aforó a 10mL con agua bidestilada. Esta reacción desarrolló un cromóforo rosado, cuya absorbancia se midió a 490nm en el espectrofotómetro Shimadzu modelo 2600. La cuantificación se hizo por interpolación de la absorbancia de cada muestra sobre la curva de calibración realizada con: (+)-catequina de 0-100mg (+)-catequina/L. Los resultados se expresaron en mg de CAT equivalentes por gramo de muestra seca.

$$\frac{mg \text{ catequina}}{g \text{ muestra}} = \frac{[a * V_t * F_d]}{p}$$

a = concentración de catequina obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L).

V_t = Volumen total del extracto (0,1L).

F_d = factor de dilución (10, 20 o 40).

p = peso de la muestra (g).

- **Catequinas (CAT), epicatequinas (EPI) y procianidinas (PC-B2 y PC-C1)**

La identificación y cuantificación simultánea de (+)-catequinas, (-)-epicatequinas y procianidinas B2 y C1, se realizó por HPLC modificando el método propuesto por Espín y Samaniego (2016, pp. 41–44). Para ello, se añadió 1mL de solución acetona/agua/ácido fórmico en proporción 70:30:0.1, a 0,1g de cacao desengrasado y se sometió al proceso de extracción en un equipo de extracción rápida de metabolitos secundarios FastPrep-24™ Classic Instrument por 1min, posteriormente se centrifugó por 15min en la centrífuga refrigerada SIGMA 4-16KS. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de ensayo y se repitió el proceso de extracción por 4 ocasiones más, obteniendo un volumen de extracto de 5mL. Con una jeringuilla acoplada a una membrana de 0,22 μm se filtró la solución en un vial ámbar de 2 mL. La identificación y cuantificación de los polifenoles se realizó en un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (Agilent Technologies) bajo las siguientes condiciones:

- Columna: C18 4,6X250mm, tamaño de partícula de 5μm.
- Temperatura de la columna: 35°C.
- Detector UV-VIS: Longitud de onda 280nm.

- Fase móvil: solvente de sistema binario que consistió en Fase móvil A: Agua/Acetonitrilo/Ácido Fórmico (99/0.8/0.2) v/v/v; Fase móvil B: acetonitrilo grado HPLC.
- Flujo: 0,8mL/min.
- Volumen de inyección: 20µL.
- Tiempo de cromatografía: 90 min.

La cuantificación se hizo por interpolación del área de cada muestra sobre la curva de calibración realizada con estándares de (+)-catequinas, (-)-epicatequinas y procianidinas (B2 y C1) (Espín & Samaniego, 2016, pp. 44–48). Los resultados se expresaron como mg de polifenol (catequina, epicatequina, procianidina B2 o C1) por g de muestra seca:

$$\frac{mg \text{ polifenol}}{g \text{ cacao}} = \frac{a * V_t * F_d}{p}$$

a = concentración de polifenol obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L).

V_t = volumen total del extracto (0,005L).

F_d = factor de dilución.

p = peso de la muestra (g).

- **Capacidad antioxidante (ABTS y FRAP)**

ABTS

La capacidad antioxidante por el método ABTS, se evaluó mediante la metodología descrita por Re et al. (1999). Para ello, se elaboró una solución activada de ABTS⁺, a partir de las soluciones de ABTS⁺ (7mM) y Persulfato de Potasio (2,45mM) en proporción 1:1. Luego, se preparó la solución de trabajo ABTS⁺ a partir de la solución activada con buffer fosfato; hasta obtener una absorbancia de 1,1 ± 0,01 a 734nm. A continuación, se tomó 200µL del extracto diluido de cacao (preparado a partir del extracto crudo obtenido en PT) al que se adicionó 3,8mL de la solución de trabajo ABTS⁺, se dejó reposar 45 minutos y se determinó la absorbancia a 734nm en un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu modelo 2600. La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó por interpolación de la absorbancia obtenida para cada muestra sobre una curva de calibración, realizada con un estándar de Trolox en concentración de 0-800µmol Trolox/L. Los resultados se expresaron como µmol Trolox equivalentes por gramo de muestra seca.

$$\frac{\mu \text{ Trolox}}{g \text{ cacao}} = \frac{a * V_t * F_d}{p}$$

a = concentración de Trolox obtenido a partir de la curva de calibración (mg/L).

V_t = volumen total de extracto (0,1L).

F_d = factor de dilución (10, 20 o 40).

p = peso de la muestra (g).

FRAP

La capacidad antioxidante por el método FRAP, se evaluó con la metodología propuesta por Babu et al. (2013, pp. 5–6). Para ello a 1mL de extracto diluido de cacao (preparado a partir del extracto crudo obtenido en PT), se añadió 2,5mL de buffer fosfato a pH 6,6 y 2,5mL de Ferrocianida de Potasio al 1% (w/v). La mezcla se incubó en baño maría a 50°C por 20min. Después, se agregó 2,5mL de Ácido Tricloroacético al 10% (w/v), 2,5mL de agua bidestilada y 0,5mL de Cloruro Férrico al 1% (p/v). La solución obtenida se dejó reposar en la oscuridad por 30min a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 700nm en el espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu modelo 2600. La cuantificación de la capacidad antioxidante se hizo por interpolación de la absorbancia obtenida para cada muestra sobre una curva de calibración realizada con Trolox (0-700 μ mol/L). Los resultados se reportan como μ moles equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca (el cálculo se realizó igual que en ABTS).

- **Metilxantinas (TBR y CAF)**

La cuantificación de teobromina y cafeína se realizó por HPLC, basándose en la metodología propuesta por la Association of Official Agricultural Chemists (1995), modificada por Marcos Paiva del Departamento de Horticultura de la Universidad de Purdue, USA y el Método MO EC 009, del Laboratorio Cantonal de Neuchatel Suiza (Espín & Samaniego, 2016, p. 45). Para ello, se hirvió 0,3g de cacao desengrasado disuelto en 90mL de agua bidestilada, hasta que el volumen se redujo a la mitad. Se añadió 1mL de Hexacianoferrato de Potasio trihidratado al 15% (w/v), 1mL de Sulfato de Zinc dihidratado al 30% (w/v) y se lavó el filtrado con agua bidestilada. Se recogió el filtrado en un balón de 100mL y se aforó. Posteriormente se pasó la solución a través de un filtro de membrana millipore de 0,22 μ m y se inyectó en el Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (Agilent Technologies) bajo las siguientes condiciones:

- Columna: ODS II; 150 mm x 4,6mm ID.
- Temperatura de la columna: ambiente (25°C).
- Detector UV-VIS: longitud de onda 273nm.
- Fase móvil: Metanol: Agua (25:75 v/v).
- Flujo: 1mL/min.
- Volumen de inyección: 20 μ L.

- Tiempo de cromatografía: 9 min.

La cuantificación se realizó por interpolación del área de cada muestra, sobre la curva de calibración realizada con estándares de Cafeína y Teobromina (Espín & Samaniego, 2016, pp. 44–48). Los resultados se expresaron en g de alcaloide por 100g de muestra seca:

$$\% \text{ Alcaloide} = \frac{a * V_t}{p} * 100$$

a = concentración de alcaloide obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L).

V_t = volumen total del extracto (0,1L).

p = peso de la muestra (g).

CAPÍTULO III

3. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Contenido de grasa (G)

La Tabla 8-3, presenta los resultados del contenido promedio de G en 6 genotipos seleccionados de cacao ecuatoriano. Observando los datos obtenidos, se establece que el contenido lipídico varía de $46,62 \pm 0,43$ a $55,04 \pm 0,32$ gramos de materia grasa por cada 100 gramos de cacao en BS. De acuerdo al nivel de fermentación, el contenido de G oscila en el rango de $45,80 \pm 0,61$ a $53,07 \pm 0,00$ y de $47,04 \pm 0,52$ a $55,04 \pm 0,32$ (g grasa/100g cacao BS) en almendras sin fermentar y fermentadas, respectivamente.

Estos resultados concuerdan en el nivel inferior del rango con los presentados por (Grassia et al., 2019, p. 4) y (Samaniego et al., 2021, p. 4) en almendras fermentadas de cacao nacional fino de aroma ($48,8 \pm 3,3$ y de $45,61 \pm 1,27$ a $52,13 \pm 0,58$ g grasa/100g cacao BS, respectivamente). Por otro lado, el contenido lipídico del material testigo ICS-95 fermentado ($55,04 \pm 0,32$ g grasa/100g cacao BS) concuerda con los datos publicados por (Cuadro, 2014, p. 37) ($54,02 \pm 0,97$ g grasa/100g cacao). De igual modo, el contenido de G reportado por (Andrade et al., 2019, p. 9) para el material ecuatoriano CCN-51 fermentado ($51,02 \pm 0,24$ g grasa/100g cacao) es semejante al obtenido en el presente estudio ($51,29 \pm 0,25$ g grasa/100g cacao BS).

Tabla 8-3: Contenido promedio de G (g grasa/100g cacao en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano

No	MS	NF	G (g grasa /100g)	
1	EEB-8	D ₀	$49,11 \pm 0,33$	d
2	EEB-8	D ₄	$49,98 \pm 0,21$	d
3	CCNC-262M	D ₀	$47,43 \pm 0,23$	e, f
4	CCNC-262M	D ₄	$47,63 \pm 0,22$	e, f
5	CCN-51	D ₀	$49,72 \pm 0,08$	d
6	CCN-51	D ₄ *	$51,29 \pm 0,25$	c
7	CCNC-037L	D ₀	$46,62 \pm 0,43$	f, g
8	CCNC-037L	D ₄	$47,83 \pm 0,08$	e
9	EET-103	D ₀	$45,80 \pm 0,61$	g
10	EET-103	D ₄	$47,04 \pm 0,52$	e, f

11	ICS-95	D ₀	53,07 ± 0,00	b
12	ICS-95	D ₄	55,04 ± 0,32	a

MS: Materiales seleccionados de cacao; NF: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; D₄*: Fermentado por 5 días; G: grasa. Los resultados están expresados como el promedio de dos réplicas (n=2) ± SD. Promedio seguido de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes con un 95% de confianza (p ≤ 0,05) según Tukey.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

En la Tabla 8-3, el contenido de G en las almendras sin fermentar de los genotipos de cacao seleccionados disminuye de la siguiente manera: ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-262M > CCNC-037L > EET-103; mientras que en las almendras fermentadas ocurre de este modo: ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-037L > CCNC-262M > EET-103. Estos resultados demuestran que los genotipos ICS-95 y CCN-51 son los que presentan el mayor contenido de G. De acuerdo a lo planteado en 2016 por Riaño et al., y en 2020 por Samaniego, este componente agrega valor a los cacaos finos, ya que el rendimiento en la producción de chocolate (principal mercado para estos productos) se estima en función del contenido de G de las almendras; debido a que presenta propiedades físicas, químicas y organolépticas que lo diferencian de otras grasas y aceites, por lo que es altamente demandado a nivel comercial (Riaño et al., 2016, p. s226; Samaniego, 2020, p. 36).

De igual manera, se observó un aumento promedio del 2,4% en el contenido lipídico tras la fermentación. Ciertamente en 2019, Perea manifestó que esto se debe a que en el proceso fermentativo se produce la muerte del embrión, lo que provoca la pérdida de la estructura celular y facilita la liberación de la manteca de cacao (Perea Villamil, 2019, p. 75). Algunos autores como Servent en 2018 y Fang en 2020, demostraron este hecho, señalando además que el aumento se produce sólo durante los primeros días (Fang et al., 2020, p. 4129); (Servent et al., 2018, p. 21). Por último, en el año 2019 Perea consideró que la G no es un parámetro lo suficientemente claro como para diferenciar las múltiples variedades de cacao (Perea Villamil, 2019, p. 75).

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza, se establece que existen diferencias estadísticas significativas en el contenido de G, según el tipo de material seleccionado de cacao y el nivel de fermentación (Anexo C). Estos resultados concuerdan con lo manifestado por (Servent et al., 2018, p. 21) y (Samaniego Maigua et al., 2021, p. 5), respecto a que el genotipo define el contenido de G, y que en función de dicha concentración se condiciona la calidad y el tratamiento de las almendras. De manera que a mayor cantidad de manteca de cacao (criollo < trinitario < forastero) más largo es el proceso de fermentación.

En la Tabla 8-3 se realizó la comparación de medias con la prueba estadística Tukey al 95% de confianza (Anexo I). Así, el contenido de G de los materiales seleccionados se agrupó en 7 subconjuntos homogéneos ordenados alfabéticamente (en orden decreciente de concentración) de

acuerdo a las diferencias estadísticas significativas. Respecto a los materiales seleccionados CCNC-262M y CCN-51, se estableció que tienen individualmente valores similares de G entre sus almendras fermentadas y sin fermentar, lo cual permitió establecer que el contenido de G no presenta diferencias estadísticas significativas tras el proceso de fermentación en estos cacaos. Por el contrario, los demás materiales seleccionados si presentaron diferencias en el contenido de G tras la fermentación.

3.2. Contenido de compuestos fenólicos (PT, FT, CAT, EPI, PC-B2, PC-C1)

3.2.1. Contenido de polifenoles totales (PT)

Observando los resultados de la Tabla 9-3, se estableció que el contenido promedio de PT en los 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano, varía en el rango de $30,01 \pm 1,03$ a $130,98 \pm 4,96$ miligramos de ácido gálico equivalente (GAE) por cada gramo de cacao desengrasado en BS. La concentración de PT de acuerdo al nivel de fermentación, oscila de $55,58 \pm 0,62$ a $130,98 \pm 4,96$ y de $30,01 \pm 1,03$ a $50,75 \pm 0,22$ (mg GAE/g cacao BS) en almendras sin fermentar y fermentadas, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por (Samaniego et al., 2020, pp. 4–6), en cacao nacional ecuatoriano fermentado ($33,55$ a $71,66$ mg GAE/g cacao BS) y con lo reportado por (Camino, 2014, p. 40) para almendras fermentadas y secas, el cual varió de 50 (mg GAE /g cacao) para cacaos forasteros a 30 (mg GAE /g cacao) para cacaos criollos. Por otro lado, la concentración fenólica del genotipo CCN-51, es inferior al obtenido por (Pallares et al., 2016, p. 11) para almendras fermentadas ($47,85 \pm 6,46$ mg GAE/g cacao) y superior al de un cacao CCN-51 amazónico colombiano ($81,4$ mg GAE/g cacao). A su vez, el contenido de PT en el material ICS-95 sin fermentar ($130,98 \pm 4,96$ mg GAE/g cacao), es superior al publicado por (Portillo, 2017, p. 8) para almendras con distintos niveles de fermentación ($99,5$ y $63,1$ mg GAE/g cacao); sin embargo, este valor si se ajusta al reportado por (Pedan, 2017, p. 29) (115 a 135 mg GAE/g cacao desengrasado, BS).

Cabe mencionar que, la diferencia en el contenido de PT entre los resultados obtenidos en esta investigación y los reportados por los autores antes mencionados, se debe a diversos factores como el origen, el estado de madurez, el clima, las características del suelo, la temperatura, el tratamiento postcosecha, etc (Afoakwa et al., 2008, p. 5; Portillo, 2017, p. 4; Samaniego, 2020, p. 35; Verdesoto, 2009, p. 38).

Tabla 9-3: Contenido promedio de PT (mg GAE/g cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano

No	MS	NF	PT (mg GAE/g)	
1	EEB-8	D ₀	70,64 ± 0,34	c
2	EEB-8	D ₄	32,26 ± 0,02	f
3	CCNC-262M	D ₀	60,70 ± 2,34	d
4	CCNC-262M	D ₄	31,59 ± 0,88	f
5	CCN-51	D ₀	89,55 ± 2,16	b
6	CCN-51	D ₄ *	37,09 ± 1,52	f
7	CCNC-037L	D ₀	71,90 ± 1,71	c
8	CCNC-037L	D ₄	30,01 ± 1,03	f
9	EET-103	D ₀	55,58 ± 0,62	d e
10	EET-103	D ₄	30,91 ± 0,25	f
11	ICS-95	D ₀	130,98 ± 4,96	a
12	ICS-95	D ₄	50,75 ± 0,22	e

MS: Materiales seleccionados de cacao; NF: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; D₄*: Fermentado por 5 días; PT: Polifenoles totales; GAE: ácido gálico equivalente. Los resultados están expresados como el promedio de dos réplicas (n=2) ± desviación estándar (SD). Promedio seguido de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes con un 95% de confianza ($p \leq 0,05$) según Tukey.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

El contenido de PT de los materiales seleccionados para este estudio disminuye de la siguiente manera en almendras de cacao sin fermentar: ICS-95 > CCN-51 > CCNC-037L > EEB-8 > CCNC-262M > EET-103; mientras que en los granos fermentados varía en este orden: ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-262M > EET-103 > CCNC-037L. Estos resultados destacan como materiales de mayor interés al ICS-95 y CCN-51, por su alto contenido. De manera análoga, en los años 2016, 2017 y 2020 Vázquez et al., Portillo y Gbogbri, señalaron respectivamente que los cacaos con alta concentración de PT son más solicitados a nivel mundial, debido a que en el procesamiento del grano se produce la disminución de este componente, lo cual reduce la astringencia (poco deseable) y las propiedades antioxidantes (deseables por sus efectos beneficiosos para la salud) (Gbogbri, 2020, p. 39; Portillo, 2017, p. 4; Vázquez et al., 2016, p. 239). Es decir, a mayor cantidad de PT en las almendras, mayor será su concentración en el producto final, mejor será su capacidad antioxidante y por tanto su calidad y beneficio económico a nivel comercial.

El análisis estadístico de los resultados (Anexo D), permitió establecer que existe un efecto del material genético y del nivel de fermentación sobre el contenido de PT ($p < 0,05$). En este sentido,

Gboghri en 2020 afirmó que el contenido de PT en el cacao, difiere no sólo por la variedad genética sino también por las variaciones individuales de las especies de árboles de cacao (Gboghri, 2020, p. 133). En base a la prueba de Tukey (Anexo J y Tabla 9-3), los genotipos de cacao ecuatoriano fermentados y sin fermentar, se agruparon en 6 subconjuntos homogéneos, ordenados alfabéticamente en orden decreciente, de acuerdo a la similitud en la concentración de PT. En este análisis se observó que las almendras sin fermentar presentaron diferencias estadísticas significativas, pero tras la fermentación los contenidos de PT fueron muy próximos entre sí, excepto para el ICS-95.

De igual manera, los resultados obtenidos revelaron una disminución entre 38,7 a 55,6 % de PT tras el proceso de fermentación y secado con relación a las almendras no fermentadas (Tablas 10-3). Esta disminución concuerda con lo reportado por (Amores et al., 2009), quienes afirmaron que una buena fermentación reduce la concentración de PT en un 40% o más.

El trabajo de Camino en 2014 y el de Portillo en 2017, evidencian que el proceso fermentativo es la etapa donde se pierde la mayor parte de PT, disminuyendo la cantidad de estos, entre un 30 a 51% (Camino, 2014, p. 10; Portillo, 2017, p. 1). A su vez, Portillo en 2017, Gboghri en 2020 y Hernández en el 2022, han indicado que esta disminución se debe a una serie de transformaciones microbiológicas, fisicoquímicas y bioquímicas, que producen fenómenos de difusión, curtido y polimerización oxidativa en el interior del grano, lo que disminuye la cantidad de polifenoles solubles (Portillo, 2017, p. 4; Gboghri, 2020, p. 58; Hernández et al., 2022, p. 6). Esto explica que el cacao sin fermentar tenga mayor cantidad de compuestos fenólicos que el cacao fermentado, ya que la concentración y la forma en que los PT están presentes en el cotiledón fermentado o no fermentado será diferente.

Tabla 10-3: Variación del contenido de PT entre almendras sin fermentar y fermentadas de materiales seleccionados de cacao ecuatoriano

MS	PT_D ₀	PT_D ₄	% Reducción
EEB-8	70,64 ± 0,34	32,26 ± 0,02	45,7
CCNC-262M	60,70 ± 2,34	31,59 ± 0,88	52
CCN-51	89,55 ± 2,16	37,09 ± 1,52*	41,4
CCNC-037L	71,90 ± 1,71	30,01 ± 1,03	41,7
EET-103	55,58 ± 0,62	30,91 ± 0,25	55,6
ICS-95	130,98 ± 4,96	50,75 ± 0,22	38,7

MS: Material seleccionado de cacao; PT: Polifenoles totales; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; *: Fermentado por 5 días.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

3.2.2. Contenido de flavonoides totales (FT)

En la Tabla 11-3, se establece que el contenido promedio de FT en los 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano varía en el rango de $43,53 \pm 1,99$ a $212,55 \pm 6,36$ miligramos equivalentes de catequina por cada gramo de cacao desengrasado en BS. Igualmente, la concentración de FT oscila de $103,03 \pm 4,46$ a $212,55 \pm 6,36$ y de $43,53 \pm 1,99$ a $64,74 \pm 2,52$ (mg CAT/g cacao BS) en almendras sin fermentar y fermentadas, respectivamente. Estos resultados son aproximados al reportado por (Andres et al., 2008, p. 3115) para polvo de cacao natural ($265,313$ mg CAT/g cacao).

Cabe añadir, que según (Urbańska & Kowalska, 2019, p. 7) la concentración de compuestos fenólicos, puede verse afectada por factores como: el tipo de extracción, el disolvente utilizado, la duración del procedimiento y el grado de fragmentación del material en investigación.

Tabla 11-3: Contenido promedio de FT (mg CAT/g cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano

No	MS	NF	FT (mg CAT/g)	
1	EEB-8	D ₀	$122,12 \pm 2,23$	b
2	EEB-8	D ₄	$43,53 \pm 1,99$	e
3	CCNC-262M	D ₀	$103,03 \pm 4,46$	c
4	CCNC-262M	D ₄	$46,15 \pm 0,28$	e
5	CCN-51	D ₀	$114,87 \pm 3,87$	b c
6	CCN-51	D ₄ *	$47,77 \pm 0,85$	e
7	CCNC-037L	D ₀	$107,15 \pm 2,04$	c
8	CCNC-037L	D ₄	$49,57 \pm 0,13$	e
9	EET-103	D ₀	$105,98 \pm 3,54$	c
10	EET-103	D ₄	$47,65 \pm 0,33$	e
11	ICS-95	D ₀	$212,55 \pm 6,36$	a
12	ICS-95	D ₄	$64,74 \pm 2,52$	d

MS: Material seleccionado de cacao; NF: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; D₄*: Fermentado por 5 días; FT: Flavonoides totales; CAT: Catequina. Los resultados están expresados como el promedio de dos réplicas (n=2) \pm desviación estándar (SD). Promedio seguido de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes con un 95% de confianza ($p \leq 0,05$) según Tukey.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

El contenido promedio de FT en los materiales seleccionados de cacao sin fermentar disminuye de la siguiente manera: ICS-95 > EEB-8 > CCN-51 > CCNC-037L > EET-103 > CCNC-262M; por otro

lado, en los granos fermentados disminuye de esta forma: ICS-95 > CCNC-037L > CCN-51 > EET-103 > CCNC-262M > EEB8. Estos resultados permitieron establecer que los genotipos ICS-95 y CCN-51 son de mayor interés debido a su alto contenido de FT. Este parámetro ha sido muy estudiado en los últimos años en el cacao, puesto que; se ha comprobado que el contenido de estos fitoquímicos está relacionado con efectos benéficos para la salud y por influir directamente en la calidad organoléptica de sus granos. Adicionalmente, autores como Toro, Ciprián, Rivarola y Di Fabio consideran que un grano con alto contenido de FT es una fuente importante de antioxidantes naturales para la formulación de alimentos nutraceuticos, como el chocolate y sus derivados o en snacks (Toro et al., 2020; Ciprián, 2020, pp. 11-16; Rivarola & Di Fabio, 2018, p. 35).

El análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza, determinó que los factores en estudios (material seleccionado de cacao y nivel de fermentación), tienen un efecto significativo sobre el contenido de FT (Anexo E). Esto concuerda con Portillo, Urbanska y Kowalska, quienes informan que el contenido de compuestos fenólicos varía en función de factores como el genotipo, el tratamiento postcosecha y el ambiente (Portillo, 2017, p. 18; (Urbańska & Kowalska, 2019, p. 1).

El análisis de comparación de medias mediante la prueba estadística Tukey al 95% de confianza (Anexo K y Tabla 12-3), muestra que en función del contenido de FT; los materiales de cacao seleccionados se agruparon en 5 subconjuntos homogéneos ordenados alfabéticamente en orden decreciente de concentración. En los materiales seleccionados fermentados, excepto el ICS-95, se observaron concentraciones similares de FT. Respecto a los materiales sin fermentar, solamente el EEB-8 e ICS-95 presentaron diferencias estadísticas significativas con relación al resto de genotipos de cacao.

Los resultados obtenidos indican que el contenido de FT disminuyó en un rango de 30,5 a 46,3% tras el proceso de fermentación y secado (Tabla 12-3). Lo cual concuerda con lo reportado por (Amores et al., 2009), quien afirma que una buena fermentación reduce la concentración de PT en un 40% o más; implicando esto, la disminución de FT y por tanto en el contenido de flavan-3-oles (CAT y EPI) y procianidinas (B2 y C1).

Tabla 12-3: Variación del contenido de FT entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano

MS	FT_ D ₀	FT_ D ₄	% Reducción
EEB-8	122,12 ± 2,23	43,53 ± 1,99	35,6
CCNC-262M	103,03 ± 4,46	46,15 ± 0,28	44,7
CCN-51	114,87 ± 3,87	47,77 ± 0,85*	41,5
CCNC-037L	107,15 ± 2,04	49,57 ± 0,13	46,3

EET-103	105,98 ± 3,54	47,65 ± 0,33	44,9
ICS-95	212,55 ± 6,36	64,74 ± 2,52	30,5

MS: Material seleccionado de cacao; FT: Flavonoides totales; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; *: Fermentado por 5 días.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

3.2.3. Contenido de flavan-3-oles (CAT y EPI) y procianidinas (B2 y C1)

En la Tabla 13-3, se presenta los resultados promedio del contenido de flavan-3-oles y procianidinas en los materiales seleccionados de cacao ecuatoriano. Por un lado, el contenido de CAT oscila de $0,75 \pm 0,03$ a $8,96 \pm 0,35$ miligramos equivalentes de CAT por gramo de cacao desengrasado en BS. La concentración de este flavan-3-ol varía de $2,79 \pm 0,04$ a $8,96 \pm 0,35$ y de $0,75 \pm 0,03$ a $5,68 \pm 0,04$ (mg CAT/g cacao BS) en almendras con 0 y 4 días de fermentación, respectivamente. Por otro lado, el contenido de EPI oscila de $0,63 \pm 0,00$ a $14,23 \pm 1,66$ miligramos equivalentes de EPI por gramo de cacao desengrasado en BS. Según el nivel de fermentación, este flavan-3-ol varía de $5,20 \pm 0,09$ a $14,23 \pm 1,66$ y de $0,63 \pm 0,00$ a $2,16 \pm 0,01$ (mg EPI/g cacao BS) en almendras sin fermentar y fermentadas, respectivamente.

Estos resultados son similares a los reportados por (Samaniego et al., 2020, p. 5) para el contenido de CAT ($4,20 \pm 0,86$ a $8,93 \pm 4,96$ mg CAT/g cacao) y EPI ($3,45 \pm 1,13$ a $13,16 \pm 3,61$ mg EPI/g cacao) en almendras de cacao ecuatoriano. A su vez, los resultados obtenidos son comparables a los publicados por (Portillo, 2017, p. 17) para el contenido de CAT ($0,83 \pm 0,2$ mg CAT/g cacao) en granos fermentados y EPI ($14,05 \pm 0,14$ y $1,97 \pm 0,05$ mg EPI/g cacao) en granos sin fermentar y fermentados. Por último, la cantidad de CAT (0,4 mg CAT/g cacao BS) y EPI (5,9 mg EPI/g cacao BS) en almendras fermentadas de cacao criollo ecuatoriano obtenida por (Grassia et al. (2019, p. 6) y la cantidad de EPI (0,04 a 3,69 mg EPI/g cacao BS) según (Krähmer et al., 2015, p. 156) difieren ligeramente de los datos propuestos en la presente investigación.

En la Tabla 13-3, se observa que el contenido promedio de PC-B2 de los cacaos ecuatorianos en estudio, se encuentra en el rango de $0,65 \pm 0,03$ a $11,08 \pm 0,17$ miligramos de PC-B2 por gramos de cacao desengrasado en BS. La concentración de esta procianidina varía de $5,65 \pm 0,08$ a $11,08 \pm 0,17$ y de $0,65 \pm 0,03$ a $5,94 \pm 0,08$ (mg PC-B2/g cacao BS) en almendras con 0 y 4 días de fermentación, respectivamente. Paralelamente, el contenido de PC-C1 oscila de $1,47 \pm 0,18$ a $25,76 \pm 2,78$ miligramos de PC-C1 por gramo de cacao desengrasado en BS. Según el nivel de fermentación esta procianidina presenta valores de $10,10 \pm 0,08$ a $25,76 \pm 2,78$ y de $1,47 \pm 0,18$ a $4,65 \pm 0,01$ (mg PC-C1/g cacao BS) en almendras sin fermentar y fermentadas, respectivamente.

Estos resultados son ligeramente inferiores a los reportados por (Samaniego et al., 2020, p. 6), para PC-B2 y PC-C1 ($1,44 \pm 0,59$ a $7,85 \pm 3,29$ y de $2,53 \pm 0,91$ a $6,52 \pm 1,55$ mg polifenol/g cacao) en granos

ecuatorianos fermentados. De igual manera, los valores propuestos por (Pedan et al., 2018, p. 282) para PC-B2 y PC-C1 ($0,52 \pm 0,14$ a $6,29 \pm 1,16$ y de $0,78 \pm 0,07$ a $5,94 \pm 1,01$ mg polifenol/g cacao) en granos de cacao fermentados de diferentes orígenes, están ligeramente por encima del límite superior del presente estudio. Por último, los datos obtenidos en este trabajo son comparables a los publicados por (Wollgast & Anklam, 2000, p. 430) para PC-B2 y PC-C1 (5,78 y 5,06 mg polifenol/g cacao), en cacaos fermentados.

La diferencia en el contenido de flavan-3-oles (CAT y EPI) y procianidinas (PC-B2 y PC-C1) entre los datos obtenidos y los reportados por los autores mencionados, puede deberse al efecto de la fermentación, secado, entre otros procesos. Cabe añadir que (Samaniego et al., 2020, p. 5) indica que la concentración de EPI generalmente es más alta que de CAT, hecho que concuerda con los datos recabados.

Tabla 13-3: Contenido promedio de CAT, EPI, PC-B2 y PC-C1 (mg polifenol/g cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano

No	MS	NF	CAT (mg CAT/g)	EPI (mg EPI/g)	PC-B2 (mg PC-B2/g)	PC-C1 (mg PC-C1/g)
1	EEB-8	D ₀	7,60 ± 0,11 e	11,60 ± 0,19 b	10,33 ± 0,02 d	15,87 ± 0,24 c
2	EEB-8	D ₄	1,27 ± 0,04 f g	1,40 ± 0,03 e	5,94 ± 0,08 e	2,79 ± 0,01 e
3	CCNC-262M	D ₀	7,99 ± 0,33 e	6,02 ± 0,12 c d	8,62 ± 0,06 b	11,30 ± 0,12 d
4	CCNC-262M	D ₄	4,78 ± 0,15 d	0,63 ± 0,00 e	0,87 ± 0,01 g	2,43 ± 0,06 e
5	CCN-51	D ₀	5,02 ± 0,02 d	12,04 ± 0,04 b	11,08 ± 0,17 a	20,53 ± 0,13 b
6	CCN-51	D ₄ *	1,01 ± 0,04 f g	1,66 ± 0,01 e	1,52 ± 0,05 f	4,45 ± 0,05 e
7	CCNC-037L	D ₀	2,79 ± 0,04 c	7,21 ± 0,08 c	6,67 ± 0,06 c	10,19 ± 0,13 d
8	CCNC-037L	D ₄	0,75 ± 0,03 g	1,08 ± 0,14 e	0,65 ± 0,03 g	1,47 ± 0,18 e
9	EET-103	D ₀	7,87 ± 0,19 e	5,20 ± 0,09 d	5,65 ± 0,08 e	10,10 ± 0,08 d
10	EET-103	D ₄	1,48 ± 0,15 f	0,97 ± 0,04 e	0,67 ± 0,14 g	1,51 ± 0,01 e
11	ICS-95	D ₀	8,96 ± 0,35 a	14,23 ± 1,66 a	10,54 ± 0,20 d	25,76 ± 2,78 a
12	ICS-95	D ₄	5,68 ± 0,04 b	2,16 ± 0,01 e	1,88 ± 0,04 f	4,65 ± 0,01 e

MS: Materiales seleccionados de cacao; NF: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; D₄*: Fermentado por 5 días; CAT: Catequinas; EPI: Epicatequinas; PC-B2 y PC-C1: Procianidinas B2 y C1. Los resultados están expresados como el promedio de dos réplicas (n=2) ± desviación estándar (SD). Promedio seguido de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes con un 95% de confianza ($p \leq 0,05$) según Tukey.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

El contenido promedio de CAT en las almendras fermentadas y sin fermentar de los materiales seleccionados de cacao ecuatoriano, se ordena de esta forma: ICS-95 > CCNC-262M > EET-103 > EEB-8 > CCN-51 > CCNC-037L. Paralelamente, el contenido de EPI disminuye de ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-037L > CCNC-262M > EET-103 y a su vez de ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 >

CCNC-037L > EET-103 > CCNC-262M, en granos sin fermentar y fermentados, respectivamente. Por otra parte, la concentración de PC-B2 se reduce de: CCN-51 > ICS-95 > EEB-8 > CCNC-262M > CCNC-037L > EET-103 en almendras sin fermentar; y de EEB-8 > ICS-95 > CCN-51 > CCNC-262M > EET-103 > CCNC-037L, en almendras fermentadas. Por último, la concentración de PC-C1 cambia de ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-262M > CCNC-037L > EET-103 y a su vez de ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-262M > EET-103 > CCNC-037L, en cacaos sin fermentar y fermentados, respectivamente.

En base a los resultados del análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza, para el contenido de CAT, EPI, PC-B2 y PC-C1, se estableció que existen diferencias estadísticas significativas en la concentración de compuestos fenólicos según el tipo de material seleccionado y el nivel de fermentación (Anexo F). En este contexto (Samaniego, 2020, p. 29), ha establecido que el contenido y composición de compuestos fenólicos dependen de factores como el genotipo y el tratamiento postcosecha. Así, por ejemplo, el genotipo de cacao Criollo tiene mayor contenido de procianidinas mientras que los cultivares Trinitario y Forastero muestran concentraciones muy bajas de este tipo de polifenoles.

El análisis de comparación de medias mediante Tukey ($\alpha = 0,05$), permitió agrupar a los materiales seleccionados de cacao de acuerdo a la similitud en la concentración de compuestos fenólicos. De manera que se obtuvo 7 subconjuntos homogéneos en función del contenido de CAT y PC-B2; y 5 subconjuntos según el contenido de EPI y PC-C1.

Se observa en la prueba de Tukey, que los materiales con mayor contenido de CAT, EPI y PC-C1 (Anexo L, Anexo M y Anexo O) antes y después de la fermentación fueron: (ICS-95 > CCN-262M > EET-103), (ICS-95 > CCN-51 > EEB-8) e (ICS-95 > CCN-51 > EEB-8), respectivamente. Notándose que las almendras fermentadas no presentaron diferencias estadísticas significativas en el contenido de EPI ni en el de PC-C1. Respecto a la PC-B2 (Anexo N), se evidencia que los materiales fermentados con mayor contenido (EEB-8 > EET-103 > ICS-95 = CCN-51) no fueron los mismos a los de las almendras sin fermentar (CCN-51 > ICS-95 = EEB-8), o al menos no en el mismo orden. Estos resultados demuestran que los materiales seleccionados de cacao ecuatoriano de mayor interés son el ICS-95, CCN-51 y EEB-8, por su alto contenido en compuestos fenólicos.

A fin de determinar la variación en el contenido fenólico tras el proceso fermentativo, se observa en la Tabla 14-3 que la cantidad de CAT y EPI se reduce entre un 40,2 - 83,2% y entre un 81,4 - 98,5%, respectivamente. Según (Portillo, 2017, p. 17), la disminución de estos polifenoles se debe a que son oxidados a quinonas por reacciones bioquímicas al acomplejarse con aminoácidos, péptidos y proteínas y polimerizar con otros polifenoles para formar taninos condensado de alto peso molecular. De esta manera, las reacciones de condensación son confirmadas por la disminución drástica en la

cantidad de flavan-3-oles durante la fermentación. Paralelamente, la variación en el contenido de PC-B2 oscila entre 9,75 - 57,53% y en las PC-C1 entre 14,43 - 21,66%. Según (Clímaco, 2008, p.178), el contenido de procianidinas y flavan-3-oles sufre una importante disminución a partir del tercer día. Durante el cuarto y quinto día de fermentación, los compuestos antes mencionados decrecen de forma escalonada, hasta llegar a ser constantes en el sexto día.

Además, (Rodríguez, 2019, p. 32) señala que no sólo el proceso de fermentación afecta al contenido de compuestos fenólicos, sino que también el incremento de temperatura durante el secado se convierte en un factor importante vinculado a la pérdida de polifenoles.

Tabla 14-3: Variación del contenido de CAT, EPI, PC-B2 y PC-C1 entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano

MS	CAT_ D ₀	CAT_ D ₄	% Reducción CAT	EPI_ D ₀	EPI_ D ₄	% Reducción EPI
EEB-8	7,60 ± 0,11	1,27 ± 0,04	83,2	11,60 ± 0,19	1,40 ± 0,03	87,9
CCNC-262M	7,99 ± 0,33	4,78 ± 0,15	40,2	6,02 ± 0,12	0,63 ± 0,00	98,5
CCN-51	5,02 ± 0,02	1,01 ± 0,04 *	60,0	12,04 ± 0,04	1,66 ± 0,01*	86,2
CCNC-037L	2,79 ± 0,04	0,75 ± 0,03	73,1	7,21 ± 0,08	1,08 ± 0,14	85,1
EET-103	7,87 ± 0,19	1,48 ± 0,15	81,0	5,20 ± 0,09	0,97 ± 0,04	81,4
ICS-95	8,96 ± 0,35	5,68 ± 0,04	36,6	14,23 ± 1,66	2,16 ± 0,01	84,8
MS	PC-B2_ D ₀	PC-B2_ D ₄	% Reducción PC-B2	PC-C1_ D ₀	PC-C1_ D ₄	% Reducción PC-C1
EEB-8	10,33 ± 0,02	5,94 ± 0,08	57,53	15,87 ± 0,24	2,79 ± 0 ,01	17,58
CCNC-262M	8,62 ± 0,06	0,87 ± 0,01	10,09	11,30 ± 0,12	2,43 ± 0,06	21,51
CCN-51	11,08 ± 0,17	1,52 ± 0,05*	13,67	20,53 ± 0,13	4,45 ± 0,05*	21,66
CCNC-037L	6,67 ± 0,06	0,65 ± 0,03	9,75	10,19 ± 0, 13	1,47 ± 0,18	14,43
EET-103	5,65 ± 0,08	0,67 ± 0,14	11,87	10,10 ± 0,08	1,51 ± 0,01	14,96
ICS-95	10,54 ± 0,20	1,88 ± 0,04	17,79	25,76 ± 2,78	4,65 ± 0,01	18,05

MS: Material seleccionado de cacao; CAT: Catequina; EPI: Epicatequina; PC-B2 y PC-C1: Procianidinas B2 y C1; D₀: Sin fermentar; D₄: fermentado por 4 días; *: Fermentado por 5 días.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

3.3. Actividad antioxidante (ABTS y FRAP)

La Tabla 15-3 muestra que la actividad antioxidante por el método ABTS, varió en un rango de $445,58 \pm 7,21$ a $1921,08 \pm 40,92$ micromoles de Trolox por gramo de cacao desengrasado en BS. De acuerdo al nivel de fermentación, el poder antioxidante por ABTS, presentó valores de $865,21 \pm 17,78$ a $1921,08 \pm 40,92$ y de $371,90 \pm 9,94$ a $801,07 \pm 2,65$ ($\mu\text{mol Trolox/g cacao BS}$) en almendras de cacao sin fermentar y fermentadas, respectivamente. En cuanto a la actividad antioxidante por el método FRAP, esta osciló de $327,99 \pm 0,86$ a $1889,13 \pm 8,15$ micromoles de Trolox por gramo de cacao desengrasado en BS. El poder antioxidante por este método varió de $623,47 \pm 34,87$ a $1889,13 \pm 8,15$ y de $283,20 \pm 2,45$ a $527,45 \pm 1,28$ ($\mu\text{mol Trolox/g cacao BS}$) en almendras con 0 y 4 días de fermentación.

Los resultados obtenidos por el método ABTS, coinciden con los propuestos por (Oracz & Nebesny, 2016, p. 1247) en cacaos fermentados de la variedad Trinitario y Forastero de África ($482,01 \pm 1,07$ y $682,71 \pm 1,55 \mu\text{mol Trolox/g cacao}$). A su vez, los datos planteados por (Oracz & Zyzelewicz, 2019, p. 7) coinciden para la actividad antioxidante por el método ABTS ($806,22 \pm 1,67$ y $680,90 \pm 1,56 \mu\text{mol Trolox/g cacao}$) y son ligeramente superiores por el método FRAP ($553,90 \pm 1,49$ y $440,49 \pm 1,42 \mu\text{mol Trolox/g cacao}$) en granos de cacao fermentado de tipo Forastero (Ghana) y Trinitario (Madagascar). Por su parte, (Perea et al., 2009, p. 131) cuantificó el poder reductor del cacao colombiano con el método ABTS, obteniendo un valor ($361,45 \pm 44,68 \mu\text{mol Trolox/g cacao}$) cercano al nivel inferior del rango presentado en este trabajo. Por último, estos resultados son similares a los obtenidos por (Muñoz, 2018, p. 50), para el método ABTS ($590,79 \pm 108,48$; $795,76 \pm 232,57$; $810,37 \pm 126,90$; y $831,21 \pm 143,08 \mu\text{mol Trolox/g cacao}$) y superiores para el método FRAP ($602,09 \pm 75,70$ y $645,03 \pm 54,11 \mu\text{mol Trolox/g cacao}$) en almendras fermentadas y secas de Cacao Nacional Fino de Aroma (Ecuador).

La diferencia observada en la actividad antioxidante de los datos obtenidos y los reportados por los autores citados, se debe a que existen diversos factores que afectan al contenido de CQNV. Uno de ellos es el método utilizado para la medición de este parámetro, ya que, tanto (Londoño, 2017, pp. 142-143) como (Urbańska & Kowalska, 2019, p. 10) indican que no existe un procedimiento estandarizado en la literatura. Por tanto, los métodos actuales pueden reportar datos inconsistentes, que no presentan equivalencias entre uno y otro, lo que lleva en algunos casos, a que la interpretación de las conclusiones vaya más allá del alcance de los resultados.

Tabla 15-3: Capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) promedio ($\mu\text{mol Trolox/g}$ cacao desengrasado en BS) en materiales seleccionados de cacao ecuatoriano

No	MS	NF	ABTS ($\mu\text{mol Trolox/g}$)		FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	
1	EEB-8	D ₀	1269,09 \pm 1,27	c	964,77 \pm 46,99	c
2	EEB-8	D ₄	546,04 \pm 5,14	h	527,45 \pm 1,28	g
3	CCNC-262M	D ₀	865,21 \pm 17,78	d e	847,33 \pm 20,43	d
4	CCNC-262M	D ₄	500,18 \pm 0,62	f h	518,36 \pm 3,32	g
5	CCN-51	D ₀	1328,72 \pm 32,60	c	1060,70 \pm 32,00	b
6	CCN-51	D ₄ *	564,67 \pm 4,30	h	351,02 \pm 2,27	h
7	CCNC-037L	D ₀	1141,03 \pm 54,95	b	739,76 \pm 31,78	e
8	CCNC-037L	D ₄	371,90 \pm 9,94	g	327,99 \pm 0,86	h
9	EET-103	D ₀	899,14 \pm 30,09	d	623,47 \pm 34,87	f
10	EET-103	D ₄	445,58 \pm 7,21	f g	283,20 \pm 2,45	h
11	ICS-95	D ₀	1921,08 \pm 40,92	a	1889,13 \pm 8,15	a
12	ICS-95	D ₄	801,07 \pm 2,65	e	489,94 \pm 19,95	g

MS: Materiales seleccionados de cacao; NF: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; D₄*: Fermentado por 5 días; ABTS y FRAP: Actividad antioxidante. Los resultados están expresados como el promedio de dos réplicas (n=2) \pm desviación estándar (SD). Promedio seguido de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes con un 95% de confianza ($p \leq 0,05$) según Tukey.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

En función del método ABTS, la actividad antioxidante disminuyó de la siguiente manera ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-037L > EET-103 > CCNC-262M, y a su vez de ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-262M > EET-103 > CCNC-037L, en las almendras sin fermentar y fermentadas, respectivamente. Paralelamente, los datos obtenidos por el método FRAP, reflejan que la actividad antioxidante disminuye como se indica a continuación: ICS-95 > CCN-51 > EEB-8 > CCNC-262M > CCNC-037L > EET-103 y de: EEB-8 > CCNC-262M > ICS-95 > CCN-51 > CCNC-037L > EET-103, en las almendras con 0 y 4 días de fermentación.

Estos resultados destacan al ICS-95, EEB-8 y CCN-51 por su alta actividad antioxidante. Según (Ramírez et al., 2013, p. 27), este hecho representa una importante ventaja competitiva en el mercado, ya que destaca a estos granos por su calidad como alimento funcional-nutracéutico y les agrega valor, debido a su potencial uso no sólo en la industria alimentaria, sino también en la industria farmacéutica y cosmética.

En base a los resultados del análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza, para la actividad antioxidante, se estableció que existen diferencias estadísticas significativas en los datos obtenidos

por los métodos FRAP y ABTS, según el tipo de material seleccionado y el nivel de fermentación (Anexo G). Esto se ha indicado anteriormente en la investigación, pero de forma indirecta, ya que se habló del contenido de PT en el cacao, el cual según diversos autores como (Cienfuegos, 2016, p. 55), está ligada a la actividad antioxidante.

En la Tabla 15-3, el análisis de comparación de medias mediante Tukey ($\alpha = 0,05$), permitió agrupar a los granos de cacao de acuerdo a su actividad antioxidante por los métodos ABTS (Anexo P) y FRAP (Anexo Q) en 8 subconjuntos homogéneos ordenados alfabéticamente, en orden decreciente de concentración.

De acuerdo al método ABTS, los materiales con mayor actividad antioxidante antes y después de la fermentación fueron el ICS-95, CCN-51 y EEB-8. Es importante destacar que el genotipo CCNC-262M sin fermentar tuvo un poder reductor similar a la del ICS-95 fermentado. Por otra parte, el método FRAP señala que todos los cacaos sin fermentar presentaron diferencias estadísticas significativas en su actividad antioxidante; mientras que los cacaos fermentados tuvieron un poder reductor semejante entre sí.

En la Tabla 16-3 se observa que la capacidad antioxidante se redujo en un rango de 42,2-58,3% y de 38,8-74,1% por ABTS y FRAP, tras el proceso fermentativo; y que sólo los granos CCNC-262M (42,4 y 38,8%) y EET-103 (50,4 y 54,6%) tuvieron resultados cercanos entre los métodos ABTS y FRAP. Al mismo tiempo, los genotipos CCNC-037L (67,4%) e ICS-95 (74,1%), son los que presentaron una mayor reducción en su actividad antioxidante de acuerdo al análisis ABTS y FRAP, respectivamente.

Cienfuegos destaca al cacao por su alto contenido de polifenoles; sin embargo, señala que, desde la recogida del grano hasta el producto final, se producen pérdidas de estos componentes en todas las etapas del proceso (Cienfuegos, 2016, p. 55). Por esta razón, durante la fermentación se busca una reducción equilibrada del contenido fenólico, de tal manera que se disminuya la astringencia y se mantenga la mayor actividad antioxidante posible para beneficio del consumidor.

Tabla 16-3: Variación de la actividad antioxidante por el método FRAP y ABTS entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano

MS	ABTS_ D ₀	ABTS_ D ₄	% Reducción	FRAP_ D ₀	FRAP_ D ₄	% Reducción
EEB-8	1269,09 ± 1,27	546,04 ± 5,14	57,0	964,77 ± 46,99	527,45 ± 1,28	45,3
CCNC-262M	865,21 ± 17,78	500,18 ± 0,62	42,2	847,33 ± 20,43	518,36 ± 3,32	38,8
CCN-51	1328,72 ± 32,60	564,67 ± 4,30	57,5	1060,70 ± 32,00	351,02 ± 2,27*	66,9
CCNC-037L	1141,03 ± 54,95	371,90 ± 9,94	67,4	739,76 ± 31,78	327,99 ± 0,86	55,7

EET-103	899,14 ± 30,09	445,58 ± 7,21	50,4	623,47 ± 34,87	283,20 ± 2,45	54,6
ICS-95	1921,08 ± 40,92	801,07 ± 2,65	58,3	1889,13 ± 8,15	489,94 ± 19,95	74,1

MS: Material seleccionado de cacao; ABTS y FRAP: Actividad antioxidante; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; *: fermentado por 5 días.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

• **Relación entre la actividad antioxidante (FRAP y ABTS) y el contenido fenólico**

Con los resultados obtenidos, se realizó una correlación lineal entre el contenido de PT (Tabla 9-3) y la eficacia de la actividad antioxidante (Tabla 16-3), analizada por el método ABTS (Gráfico 2-3) y FRAP (Gráfico 3-3); logrando resultados de $r^2 = 0,9687$ y $r^2 = 0,9254$, respectivamente. Según (Nazario et al., 2014, p. 56), al tener un r^2 de 0,9, se evidencia una correlación fuerte entre el contenido de PT y la actividad antioxidante. Esto se observa especialmente durante el proceso fermentativo de los granos de cacao, donde se forman compuestos condensados (taninos) a partir de los PT de las almendras sin fermentar, lo que produce una disminución de la actividad antioxidante en las almendras fermentadas; comprobando así la relación directa entre estos dos parámetros.

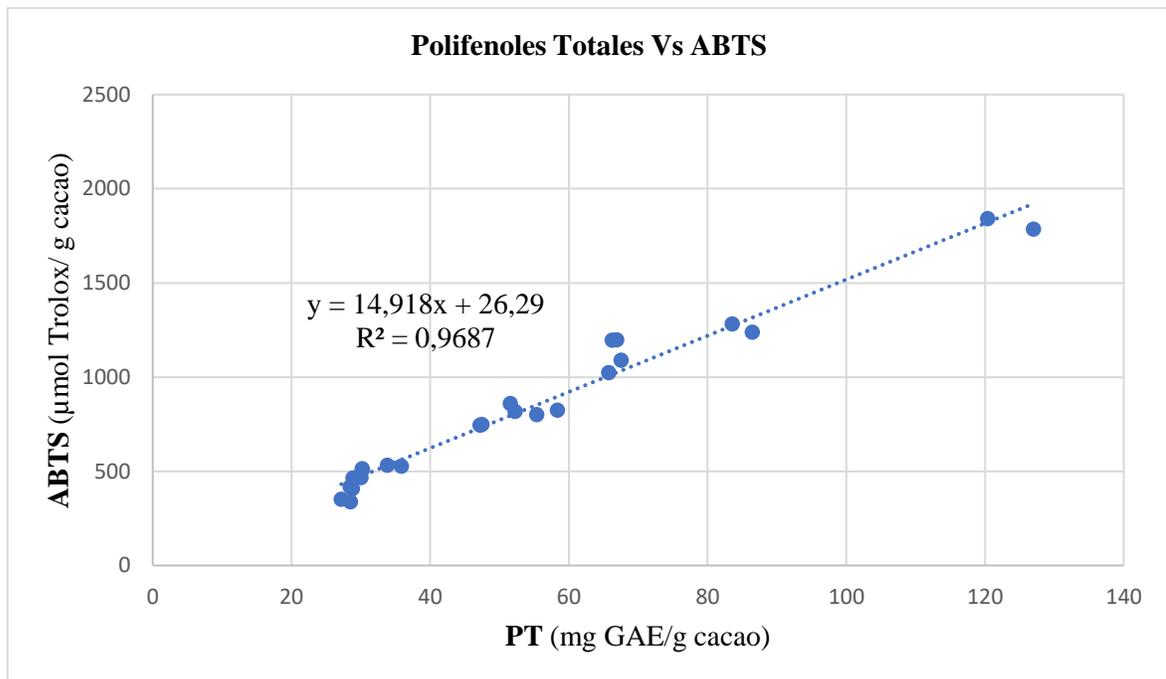


Gráfico 2-3. Correlación entre el contenido de PT y la eficacia de la actividad antioxidante (ABTS)

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

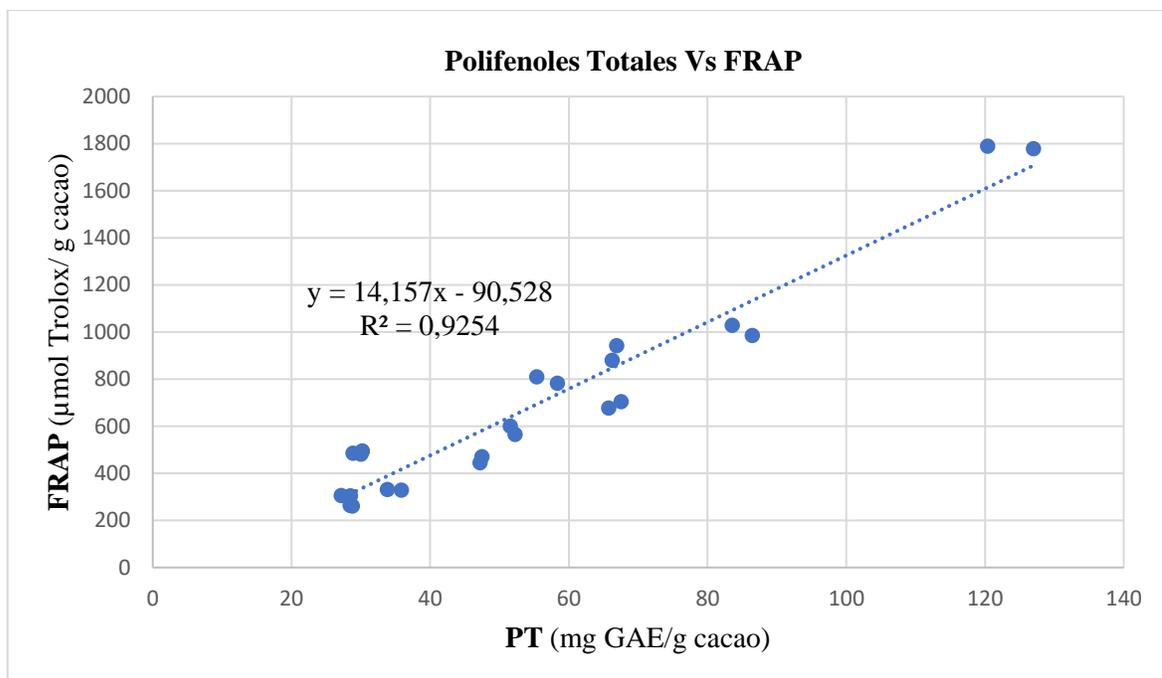


Gráfico 3-3. Correlación entre el contenido de PT y la eficacia de la actividad antioxidante (FRAP)

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

3.4. Contenido de alcaloides (TBR y CAF)

La Tabla 17-3, muestra que el contenido promedio de TBR de las almendras de cacao en estudio, varía en el rango de $1,105 \pm 0,01$ a $2,32 \pm 0,03$ gramos de TBR por cada 100 gramos de cacao desengrasado en BS. La concentración de esta metilxantina oscila de $1,25 \pm 0,01$ a $2,32 \pm 0,03$ y de $1,105 \pm 0,01$ a $1,845 \pm 0,01$ (g TBR/100g cacao BS) en almendras con 0 y 4 días de fermentación. Paralelamente, el contenido de CAF fluctúa de $0,225 \pm 0,01$ a $0,475 \pm 0,01$ gramos de CAF por cada 100 gramos de cacao desengrasado en BS. Según el nivel de fermentación, esta metilxantina presenta valores de $0,26 \pm 0,00$ a $0,475 \pm 0,01$ y de $0,225 \pm 0,01$ a $0,425 \pm 0,01$ (g CAF/100g cacao BS) en almendras sin fermentar y fermentadas, respectivamente.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por (Samaniego et al., 2020, p. 4) en almendras de cacao ecuatoriano fermentado, se observa que los datos son similares en el contenido de CAF ($0,20 \pm 0,05$ a $0,43 \pm 0,11$ g CAF/100g cacao) e inferiores en el de TBR ($1,52 \pm 0,21$ a $2,43 \pm 0,18$ g TBR/100g cacao). A su vez, los valores del presente estudio son inferiores a lo expuesto por (Camino, 2014, pp. 70-73) para la concentración de TBR (1,27 a 2,84 g TBR/100g cacao) y CAF (0,15 a 0,51 g CAF/100g cacao) en granos de cacao nacional fino de aroma fermentado.

Por otro lado, (Peláez et al., 2016, p. 362) reportan que el cacao peruano tiene concentraciones similares de TBR ($1,088 \pm 0,009$ a $1,449 \pm 0,004$ g TBR/100g cacao BS) y CAF ($0,204 \pm 0,01$ a $0,410 \pm 0,03$ g

CAF/100g cacao BS) en granos sin fermentar. Sin embargo, los granos fermentados y secos investigados por estos autores, presentan un menor contenido de TBR ($1,002 \pm 0,019$ a $1,282 \pm 0,003$ g TBR/100g cacao BS) y de CAF ($0,155 \pm 0,00$ a $0,277 \pm 0,02$ g CAF/100g cacao BS) en comparación a los 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano estudiados en este trabajo. Finalmente, la cantidad de TBR (de 2,23 a 3,02 y de 1,73 a 2,78 g TBR/100g cacao) y CAF (0,28 a 1,11 y de 0,32 a 0,64 g CAF/100g cacao) presentadas por (Krähmer et al., 2015, p. 156) en almendras con 0 y 4 días de fermentación, es superior a los valores reportados en este estudio en los diferentes materiales seleccionados. Esta diferencia en la concentración de metilxantinas se debe a que estos autores trabajaron con granos africanos, que son considerados como forasteros, los cuales usualmente tienen altos contenidos de TBR y CAF.

Las diferencias antes mencionadas respecto al contenido de metilxantinas ocurren según (Hernández et al., 2022, p. 1) por diversos factores como: la variedad, el origen y el procesamiento del grano (en particular el método de fermentación y secado). En referencia a lo anterior, (Martínez, 2014, p. 60) indica que el procesamiento reduce la composición química bioactiva (como polifenoles y metilxantinas), lo que influye en la composición química y las propiedades organolépticas del cacao y sus derivados.

Tabla 17-3: Contenido promedio de TBR y CAF (g alcaloide/ 100g cacao desengrasado en BS) en muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano

No	MS	NF	TBR (g TBR/100g)		CAF (g CAF/100g)		TBR/CAF	
1	EEB-8	D ₀	2,32 ± 0,03	a	0,32 ± 0,01	b, c, d	7,79 ± 0,28	a
2	EEB-8	D ₄	1,85 ± 0,01	f	0,31 ± 0,01	b, c, d, e	6,34 ± 0,16	abcd
3	CCNC-262M	D ₀	1,88 ± 0,04	f	0,29 ± 0,01	c, d, e, f	7,03 ± 0,26	ab
4	CCNC-262M	D ₄	1,23 ± 0,05	d, e	0,27 ± 0,02	d, e, f	5,00 ± 0,57	cdef
5	CCN-51	D ₀	1,84 ± 0,00	f	0,28 ± 0,05	d, e, f	7,20 ± 1,22	ab
6	CCN-51	D ₄ *	1,39 ± 0,04	c	0,23 ± 0,01	f	6,60 ± 0,36	abc
7	CCNC-037L	D ₀	1,25 ± 0,01	d	0,26 ± 0,00	d, e, f	5,17 ± 0,13	cdef
8	CCNC-037L	D ₄	1,11 ± 0,01	e	0,25 ± 0,00	e, f	4,82 ± 0,06	def
9	EET-103	D ₀	1,86 ± 0,01	f	0,36 ± 0,01	b	5,64 ± 0,11	bcde
10	EET-103	D ₄	1,69 ± 0,02	b	0,35 ± 0,00	b, c	5,25 ± 0,08	cdef
11	ICS-95	D ₀	1,83 ± 0,05	f	0,48 ± 0,01	a	4,06 ± 0,01	ef
12	ICS-95	D ₄	1,50 ± 0,04	c	0,43 ± 0,01	a	3,76 ± 0,04	f

MS: Materiales seleccionados de cacao; NF: Nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; D₄*: Fermentado por 5 días; TBR: Teobromina; CAF: Cafeína. Los resultados están expresados como el promedio de dos réplicas (n=2) ± desviación estándar (SD). Promedio seguido de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes con un 95% de confianza ($p \leq 0,05$) según Tukey.

Realizado por: Toaquiza, Valeria; Samaniego, Iván, 2021.

De acuerdo al nivel de fermentación, el contenido promedio de TBR varía en el siguiente orden en las almendras sin fermentar: EEB-8 > CCNC-262M > EET-103 > CCNC-51 > ICS-95 > CCNC-037L; mientras que en las fermentadas se reduce de la siguiente forma: EEB-8 > EET-103 > ICS-95 > CCN-51 > CCNC-262M > CCNC-037L. A su vez, el contenido de CAF en almendras sin fermentar varía de este modo: ICS-95 > EET-103 > EEB-8 > CCNC-262M > CCN-51 > CCNC-037L; y en las fermentadas de esta manera: ICS-95 > EET-103 > EEB-8 > CCNC-262M > CCNC-037L > CCN-51. Estos resultados muestran que los granos ICS-95, EET-103 y EEB-8, son los materiales que presentan mayor contenido de TBR y CAF.

El análisis de varianza (ANOVA) bifactorial ($\alpha = 0,05$) refleja que existen diferencias estadísticas significativas en el contenido de metilxantinas (excepto en la relación MS*NF de las CAF) en los 6 materiales seleccionados de cacao fermentado y sin fermentar (Anexo H). Esto significa que la concentración de TBR en un mismo tipo de grano antes y después de la fermentación es diferente, también indica que no existe similitud entre el contenido de TBR de las almendras fermentadas y sin fermentar de los diferentes materiales seleccionados. Esto no se observa en el caso de la CAF.

La comparación de medias mediante Tukey ($\alpha = 0,05$), permitió agrupar a los materiales de cacao de acuerdo a su contenido de TBR y CAF en 6 subconjuntos homogéneos ordenados alfabéticamente en orden decreciente de concentración (Tabla 17-3). En el Anexo R, se visualiza que no existen diferencias estadísticas significativas en el contenido de TBR entre los cacaos no fermentados, exceptuando al material EEB-8. En el Anexo S, no se observa que el contenido de CAF presente diferencias estadísticas significativas.

La Tabla 18-3, evidenció que la concentración de TBR y CAF se redujo entre un 9,16 – 34,8% y entre un 1,41- 18,2%, respectivamente. De acuerdo con (Vázquez et al., 2016, p. 249) y (Samaniego, 2020, p. 23) la pérdida de alcaloides puede ser hasta de un 30%, dato que concuerda con los obtenidos en el estudio. Tanto (Vázquez et al., 2016, 239), como (Peláez et al., 2016b, p. 355) y (Peláez et al., 2016a, p. 117), señalan que el contenido de alcaloides disminuye de acuerdo al genotipo y el procesamiento postcosecha, de manera que la fermentación y secado reduce el contenido de metilxantinas y mejora la calidad organoléptica de las almendras de cacao, dando un balance adecuado de amargor deseable en los cacaos finos. De igual manera, los autores indican que estos compuestos químicos son responsables de la calidad sensorial del cacao, que inciden de manera directa en el sabor amargo, la palatabilidad de las almendras y de manera indirecta sobre los precursores del aroma.

Tabla 18-3: Variación del contenido de TBR y CAF entre almendras sin fermentar y fermentadas de muestras seleccionadas de cacao ecuatoriano

MS	TBR_ D ₀	TBR_ D ₄	% Reducción	CAF_ D ₀	CAF_ D ₄	% Reducción
EEB-8	2,32 ± 0,03	1,85 ± 0,01	20,5	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	3,12
CCNC-262M	1,88 ± 0,04	1,23 ± 0,05	34,8	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,02	7,02
CCN-51	1,84 ± 0,00	1,39 ± 0,04	24,7	0,28 ± 0,05	0,23 ± 0,01*	18,2
CCNC-037L	1,25 ± 0,01	1,11 ± 0,01	11,6	0,26 ± 0,00	0,25 ± 0,00	3,85
EET-103	1,86 ± 0,01	1,69 ± 0,02	9,16	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,00	1,41
ICS-95	1,83 ± 0,05	1,50 ± 0,04	18,1	0,48 ± 0,01	0,43 ± 0,01	10,5

MS: Material seleccionado; TBR: Teobromina; CAF: Cafeína; D₀: Sin fermentar; D₄: Fermentado por 4 días; *: Fermentado por 5 días.

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

- **Relación TBR/CAF**

Tras la cuantificación de metilxantinas, se determinó la relación TBR/CAF en los 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano sin fermentar y fermentados, cuyos valores se encuentran en el rango de $4,06 \pm 0,01$ a $7,79 \pm 0,28$ y de $3,76 \pm 0,04$ a $6,34 \pm 0,16$, respectivamente (Gráfico 4-3). De acuerdo con (Vázquez et al., 2016, p. 242), la relación TBR/CAF es un parámetro que permite demostrar la “fineza” del cacao, así como la variedad a la que pertenece, por tanto, es una herramienta importante para certificar la calidad de las almendras. De esta manera, el cacao “fino” tienen un índice de TBR/CAF <4 (Criollo), y de 4-9 (Trinitario); mientras el cacao a “granel” tienen un índice de TBR/CAF >9 (Forastero). En este contexto las almendras de cacao ecuatoriano analizadas se pueden considerar como materiales “finos” de tipo Trinitario.

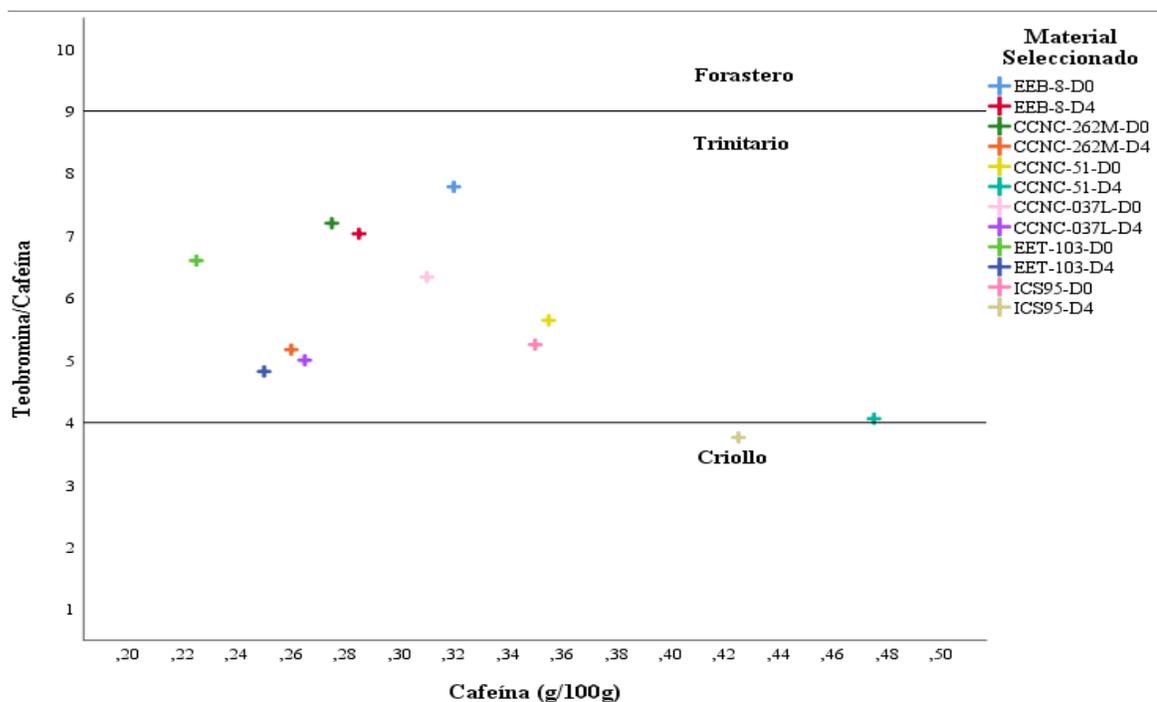


Gráfico 4-3. Relación entre el contenido de metilxantinas y el genotipo de cacao

Realizado por: Toaquiza, Valeria. 2021.

En la Tabla 17-3, se evidencia que la relación TBR/CAF del material ICS-95 fermentado ($3,76 \pm 0,04$) es similar a los valores (3,67 y 3,44) reportados por (Camino, 2014, p. 49) y (Cuadro, 2014, p. 39). Por ende, se deduce que el grano ICS-95 es de tipo Trinitario, concordando esto con lo propuesto por (Gómez et al., 2018, p. 11). La relación TBR/CAF del cacao CCN-51 fermentado ($6,60 \pm 0,36$) es cercano al valor obtenido por (Camino, 2014, p. 49) en almendras de cacao nacional (6,88), por consiguiente este cacao es de tipo Trinitario, lo cual es confirmado por (Amores, 2019), (Arellano, 2020, p. 13) y (Vera et al., 2014, p. 23). La relación TBR/CAF del clon EET-103 en almendras fermentadas ($5,25 \pm 0,08$) es superior al valor (3,66) manifestado por (Cuadro, 2014, p. 37), lo cual indicaría que no se trata de un cacao Trinitario, sino de un cacao Criollo. De acuerdo a (Alarcón, 2019, pp. 8-23) y (Vera et al., 2014, p. 23) la almendra EET-103 es un cacao fino de aroma cuyo genotipo es Nacional x Venezolano. Para concluir, el material EEB-8 hasta el momento no ha sido clasificado según su variedad; pero de acuerdo a los resultados obtenidos en almendras sin fermentar ($7,79 \pm 0,28$) y fermentadas ($6,34 \pm 0,16$), se puede considerar a este grano como un cacao de tipo Trinitario.

Finalmente, en la investigación publicada por Samaniego y otros autores en el año 2020, se recalca que en Ecuador existen pocas plantaciones de cacao Nacional genéticamente puro, sino que son una mezcla de híbridos naturales con materiales Trinitarios, lo que se conoce como cacaos del “Complejo Nacional X Trinitario” (Samaniego et al., 2020, p. 5).

3.5. Análisis de componentes principales (ACP) en cacao ecuatorianos

El Análisis de Componentes Principales (ACP) permitió evaluar de manera integral, las relaciones entre los principales CQNV de los genotipos de cacao de acuerdo a su nivel de fermentación.

El ACP consideró como observaciones los 12 individuos obtenidos de 6 genotipos de cacao ecuatoriano con 2 niveles de fermentación (D_0 y D_4) y como variables a los contenidos de CQNV (Anexo B). El resultado de dicho análisis se presentó como un diagrama de dispersión bidimensional, con un 95% de confianza, en donde 2 de los componentes principales (CP), que fueron combinaciones lineales de las variables estudiadas, explicaron hasta el 82,53% de la varianza total (correlación entre todas las variables). El primer CP (CP1) supuso el 65,11% del total de variabilidad, el cual tuvo cargas positivas para las variables de PC-B2, EPI, PC-C1, ABTS, FRAP, FT, PT, TBR. El segundo CP (CP2) representó el 17,42% del total de varianza y correlacionó positivamente con la relación TBR/CAF y negativamente con la G, CAF.

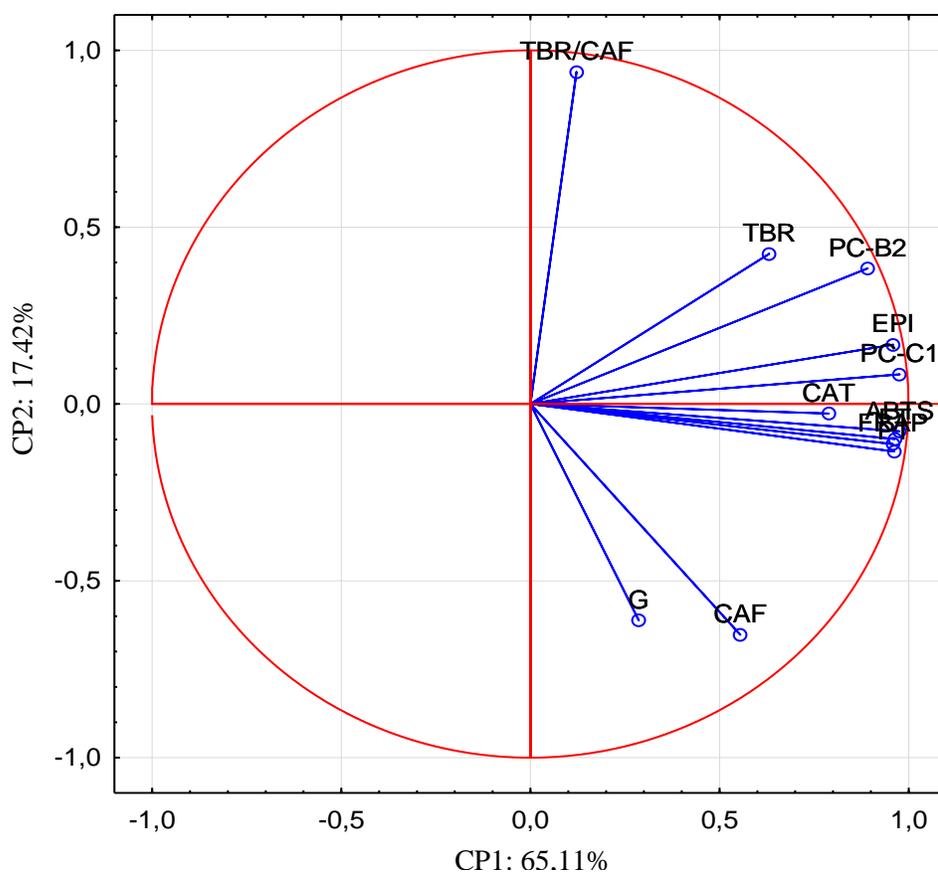


Gráfico 5-3. Proyección de las variables en el plano

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

En el Gráfico 5-3, se observan los resultados del ACP, donde los vectores representaron las proyecciones de las variables obtenidas de los diferentes CQNV, reflejando el nivel de correlación entre cada variable analizada.

Los vectores que representaron a las variables de compuestos fenólicos (PT, FT, CAT, EPI, PC-B2, PC.C1) y actividad antioxidante (ABTS, FRAP), estuvieron muy correlacionados debido a la proximidad de sus vectores dentro del plano, confirmando la alta correlación que existe entre estos parámetros.

El vector que simbolizó la relación TBR/CAF, se proyectó en el cuadrante opuesto al de CAF, por lo que se consideró que estas dos variables tuvieron una relación inversamente proporcional. Esto permitió determinar que los granos que poseen un alto contenido de CAF en su composición presentan relaciones TBR/CAF bajas, y por lo mismo tienen la tendencia a ser cacaos finos. A su vez, se observó que el vector G se proyectó muy cercano al de CAF, en este caso los granos de cacao que se encontraron en el área de influencia de estos vectores presentaron un elevado contenido de G, y tienden a ser considerados cacaos finos de aroma, lo que representa un beneficio para la industria cacaotera.

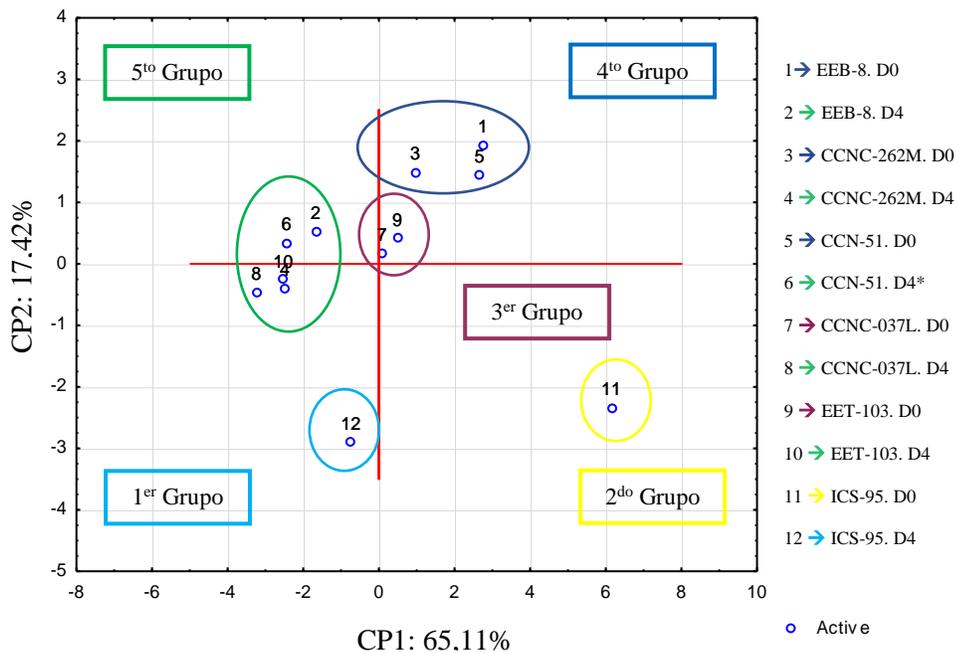


Gráfico 6-3. Proyección de 6 genotipos de cacao ecuatoriano con 2 niveles de fermentación (12 individuos) en el plano

Realizado por: Toaquiza, Valeria, 2021.

En el Gráfico 6-3, se observan los resultados del ACP, donde los puntos que se encuentran del 1 al 12, representaron las proyecciones de los individuos en el plano elegido.

En el análisis multivariado, se diferenció claramente que los cacaos sin fermentar (impares) se encontraron en el lado positivo de CP1, mientras que los fermentados (pares) estuvieron en el lado opuesto. El gráfico evidenció que la fermentación afectó al contenido de CQNV, dado que la proyección de los individuos fermentados fue opuesta al de las variables.

Este análisis permitió agrupar los genotipos de cacao en función de su contenido de G, compuestos fenólicos, metilxantinas y capacidad antioxidante. De esta manera se identificaron 5 grupos que clasificaron a la población de 12 individuos, con el propósito de establecer categorías de rangos en función del contenido de las variables.

Los individuos del primer y segundo grupo (12 y 11) pertenecieron al genotipo ICS-95, el cual demostró tener las mejores características en comparación al resto de cacaos. Ya que, como se observa en el Gráfico 6-3, este presentó altos valores de CQNV antes y después de la fermentación. Además, su baja relación TBR/CAF, indica que son cacaos Trinitarios con tendencia hacia cacaos Criollos.

El tercer grupo (7 y 9), se podría considerar como el de menor contenido de CQNV entre los granos sin fermentar, dada su posición en el gráfico

El cuarto grupo (1, 3 y 5) presentó un alto contenido fenólico, una elevada actividad antioxidante y una relación TRB/CAF superior a la media, por lo que estos granos antes del proceso de fermentación tuvieron un comportamiento similar al de cacaos Trinitarios con tendencia hacia cacaos Forasteros.

Del quinto grupo (2, 4, 6, 8, 10) los individuos 2 y 6 presentaron un menor contenido de PT, FT, CAT y una menor capacidad antioxidante, esto se debió a que se oponen diametralmente a los vectores que representan los compuestos antes señalados. Cabe mencionar que, pese a lo expuesto anteriormente, es el grupo que presentó valores más homogéneos entre sí. Además, todo este grupo al estar cercano a los ejes del CP2 y alejados del vector TBR/CAF, mostraron un comportamiento típico de granos Trinitarios.

Aunque el ICS-95 (11 y 12) presentó el mayor contenido de CQNV y la menor relación TBR/CAF, al ser utilizado como testigo, se consideró al material EET-103 (9 y 10) como el más fino, debido a que gozó de la menor relación TBR/CAF y además fue uno de los que mayor contenido de CQNV presentó entre los cacaos fermentados y sin fermentar.

Finalmente, se evidenció que el Ecuador cuenta con una gran diversidad genética de cacaos finos de aroma, y que junto a las excelentes características del material ICS-95 se pueden generar, por medio de hibridación, cacaos de gran calidad con elevado contenido de G, compuestos fenólicos y por tanto gran actividad antioxidante.

CONCLUSIONES

- Se evaluaron los principales componentes químicos asociados a la calidad de los materiales seleccionados de cacao ecuatoriano.
- Se cuantificó el contenido de grasa (G), compuestos fenólicos (PT, FT, CAT, EPI, PC-C1, PC-B2), alcaloides (TBR, CAF) y la actividad antioxidante (ABTS, FRAP) de seis materiales seleccionados de cacao ecuatoriano. En base al análisis estadístico de los datos obtenidos, se determinó que las almendras que presentaron mayor cantidad de CQNV son el ICS-95, EBB-8 y el CCN-51.
- La relación TBR/CAF permitió clasificar a los materiales seleccionados de cacao como “finos” de tipo Trinitario, siendo el ICS-95 el genotipo más fino seguido del EET-103. Así se confirma que en Ecuador los materiales de cacao Nacional se encuentran hibridados con materiales seleccionados de Trinidad y Tobago, y se lo conoce como cacaos del tipo Nacional X Trinitario.
- Se determinó que el proceso de fermentación y secado tuvo un efecto positivo en el contenido de grasa (2,4%) de los 6 materiales seleccionados de cacao ecuatoriano, y un efecto negativo en el contenido fenólico (54,1%), teobromina (19,8%), cafeína (7,3%) y actividad antioxidante (55,7%).
- Se evaluó la relación entre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante, determinándose que tienen una relación lineal fuerte con una correlación de $R^2= 0,9687$ (PT Vs ABTS) y $R^2= 0,9254$ (PT Vs FRAP). La investigación contribuyó en la evaluación de las almendras de cacao ecuatoriano, aportando valores e interpretaciones acerca del contenido de grasa, compuestos fenólicos, alcaloides y la actividad antioxidante; factores que están directamente relacionados con la calidad, aroma y sabor del cacao nacional.

RECOMENDACIONES

- Realizar los análisis químicos inmediatamente después de que las muestras de cacao son molidas y desengrasadas, ya que los compuestos fenólicos se oxidan con facilidad, independientemente del método de almacenamiento utilizado.
- Complementar el presente estudio con análisis sensoriales y con la evaluación del perfil de compuestos químicos volátiles, para que con este tipo de trabajos se reafirme la calidad del cacao nacional, a la vez que se divulga con bases fundamentadas la calidad de sus almendras.
- Llevar a cabo nuevas investigaciones sobre la composición del cacao y sus subproductos en las diferentes variedades de cacao ecuatoriano, para realizar una base de datos sobre el contenido de componentes químicos que facilite su análisis, ya que estos influyen sobre la capacidad antioxidante, la calidad del producto y el precio del cacao ecuatoriano en el mercado internacional.

BIBLIOGRAFÍA

ABRIL, N; et al. Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas [en línea]. 2018. [Consulta: 04 agosto 2021]. Disponible en: https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf.

AFOAKWA, E.O. *Cocoa production and processing technology* [en línea]. New York-USA: CRC Press, 2014. [Consulta: 19 junio 2021]. ISBN 978-0-429-17443-8. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781466598249>

AFOAKWA, E.O; et al. "Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 48, no. 9 (2008), (United Kingdom) pp. 840-857. ISSN 1040-8398, 1549-7852. DOI 10.1080/10408390701719272.

ALARCÓN, G.L. Evaluación del comportamiento agro morfológico de cuatro clones de *Theobroma cacao L.* (cacao) con tres distanciamientos de siembra. [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Estatal del Sur de Manabí, Ecuador. 2019. pp. 14-42. [Consulta: 20 julio 2021]. Disponible en: <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/1550/1/TEMA-CACAO-ORIGINAL-titulaci%C3%B3n-final-dic-del-2019.pdf>.

ÁLVAREZ, E; & ORALLO, F. "Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer". *Offarm* [en línea], 2003, (España), 22(10), pp. 130-140. [Consulta: 27 agosto 2021]. ISSN 0212-047X. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13054406>

ALVAREZ, O. *Qué es la teobromina y cuáles son sus propiedades* [blog]. 11 julio 2017. [Consulta: 18 julio 2021]. Disponible en: <http://www.observatoriodelcacao.com/2017/07/11/que-es-la-teobromina-y-cuales-son-sus-propiedades/>.

AMAYA, L.M; & PORTILLO, C.E. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible [en línea]. (Trabajo de titulación). (Licenciatura). Universidad de El Salvador, El Salvador. 2013. [Consulta: 25 agosto 2021]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5311/1/16103410.pdf>.

AMORES, F.M. "La ruta genética que ubica al clon CCN 51 en el grupo de los cacaos finos". *Aprocafa. Asociación de Productores de Cacao Fino y de Aroma* [en línea]. 2019. (Ecuador). [Consulta: 19 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.aprocafa.net/homenaje-a-homero-castro>.

AMORES, F.M; et al. "Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nororiente de la provincia de Esmeraldas". Boletín técnico #135 de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, Ecuador: INIAP, 2009. [Consulta: 01 septiembre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1565>

ANDRADE, J.A; et al. "Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú". *Enfoque UTE* [en línea], 2019, (Ecuador) 10(4), pp. 1-12. [Consulta: 21 septiembre 2021]. ISSN 1390-6542, 1390-9363. DOI 10.29019/enfoque.v10n4.462. Disponible en: <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/enfoqueute/v10n4/1390-6542-enfoqueute-10-04-00001.pdf>

ANDRES, C; et al. "Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: Influence of the manufacturing process". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 9 (2008), (España), pp. 3111-3117. ISSN 0021-8561, 1520-5118. DOI 10.1021/jf0728754.

ARELLANO, B.F. Compatibilidad del cacao Nacional Centenario (*Theobroma cacao* L) en la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería). Universidad de Guayaquil, Ecuador. 2020. [Consulta: 19 noviembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/50290/1/Arellano%20Escudero%20Bryan%20Felipe.pdf>.

ARROYO, C. Determinación del contenido graso de leche en polvo: extracción Soxhlet [en línea]. 2005. [Consulta: 07 agosto 2021]. Disponible en: <https://docplayer.es/26803532-Practica-5-determinacion-del-contenido-graso-de-leche-en-polvo-extraccion-soxhlet.html>.

ARTAJO, L.S. "La astringencia en el café". *Revista Fórum Café* [en línea], 2020. [Consulta: 08 octubre 2021]. ISSN 2696-3035. Disponible en: <https://www.revistaforumcafe.com/astringencia>

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. AOAC Official Method 980.14 (1995). Theobromine and caffeine in cacao products. Liquid Chromatographic method.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. AOAC Official Method 920.157 (1997). Melting point of fats and fatty acids. Capillary tube method.

BABU, D; et al. "Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models". *Journall of Medicinal Plant Research* [en línea], 2013, (India) 7(39), pp. 2898-2905. [Consulta: 25 agosto 2021]. ISSN 1996-0875. Disponible en: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/75864D741228>

BANCO CENTRAL DEL ECUADOR. Cuentas nacionales del primer trimestre de 2021, 2021. [Consulta: 7 septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo/item/1434-en-el-primer-trimestre-de-2021-la-economia-ecuatoriana-crecio-0-7-respecto-al-trimestre-anterior-y-reporto-una-variacion-interanual-de-5-6-respecto-al-primer-trimestre-de-2020>.

BENÍTEZ, J.A. Perfil aromático de cacao fino de aroma ecuatoriano [en línea]. (Trabajo de titulación). (Bioquímico Farmacéutico) Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador. 2015. pp.2-50. [Consulta: 25 agosto 2021]. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/13218/3/Benitez%20Campoverde%20Jonathan%20Andres.pdf>.

CAMACHO, D.K. Caracterización fisicoquímica y funcional de una población de segregantes de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) [en línea]. (Trabajo de titulación). (Química de Alimentos) Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador. 2019. [Consulta: 30 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18018/1/T-UCE-0008-CQU-091.pdf>.

CAMINO, C.E. Estudio del contenido de grasa, alcaloides y polifenoles totales en almendras de cacao nacional fino de aroma en zonas del litoral ecuatoriano para comparar su calidad y facilitar su comercialización. [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. 2014. [Consulta: 25 agosto 2021]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8460/1/BQ%2061.pdf>.

CARBAJAL, Á. Manual de nutrición y dietética [en línea]. 2019. España: Universidad Complutense de Madrid. [Consulta: 4 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-12-bioactivos.pdf>.

CARTAYA, O; & REYNALDO, I. "Flavonoides: características químicas y aplicaciones". *Cultivos Tropicales* [en línea], 2001, (Cuba) 22(2), pp. 5+. [Consulta: 17 agosto 2021]. ISSN 02585936. Disponible en: <https://link.gale.com/apps/doc/A146790746/AONE?sid=googleScholar&xid=e07d2dfc>

CHACON, M. ¿Qué es un clon de cacao?, Oficina Nacional de Semillas Costa Rica, 2020. [Consulta: 28 junio 2021]. Disponible en: <http://ofinase.go.cr/certificacion-de-semillas/certificacion-de-semilla-de-cacao/clones/>.

CIENFUEGOS, E. Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli)fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido [en línea]. (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad de Murcia, España. 2016. 213 p. [Consulta: 03 noviembre 2021]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/371732#page=18>.

CIPRIÁN, M. Aplicación de la cáscara del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) como fuente de flavonoides en productos a base de cereales: Revisión de literatura [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 2020. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6937/1/AGI-2020-T014.pdf>.

CLÍMACO, O. Caracterización y tipificación de parámetros físicos, químicos, físico-químicos y componentes del sabor y aroma de una población de cacao criollo híbrido (*Theobroma cacao L.*) de Venezuela (Trabajo de titulación) (Doctorado). Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela. 2008.

COFRÉ, A. Determinación de polifenoles totales, actividad antioxidante y antocianinas de jugo de murtilla (*Ugni molinae Turcz*) obtenido por condensación de vapor [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 2015. [Consulta: 25 septiembre 2021]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2015/fac675d/doc/fac675d.pdf>.

CROSS, V; et al. "Recherche d'un indice de fermentation du cacao. Evolution des tanins et des phénols totaux de la feve". *Cacao-Café, Thé Paris*, vol. 26, no 2 (1982), (Francia) pp. 109-114.

CUADRO, W.A. Estudio comparativo de clones experimentales y comerciales de cacao (*Theobroma cacao L.*) en función del perfil físico-químico-sensorial de sus almendras. [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador. 2014. [Consulta: 15 septiembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/2525/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-51.pdf>.

CUÑAT, J. Aroma y sabor en los alimentos. Propiedades organolépticas. 2016. [Consulta: 16 agosto 2021]. Disponible en: <https://valenciagastronomica.com/aroma-y-sabor-en-los-alimentos-propiedades-organolepticas/>.

DELGADO, J; et al. "Development of dark chocolate with fermented and non- fermented cacao nibs: total polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity and sensory evaluation". *Scientia Agropecuaria*, vol. 9, no. 4 (2018), (Perú) pp. 543-550. ISSN 23066741. DOI 10.17268/sci.agropecu.2018.04.10.

DE LA CRUZ PEREA, C; et al. Evolución de compuestos no volátiles durante la fermentación del cacao [en línea]. 2018. [Consulta: 25 agosto 2021]. Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_VI/CARTEL/CVI-27.pdf

EDEM, J; et al. "Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile". *Food Research International*, vol. 82 (2016), pp. 44-52. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2016.01.012.

ESPÍN, S; & SAMANIEGO, I. *Manual para el análisis de parámetros químicos asociados a la calidad del cacao*. Manual Nro 105, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina, Quito- Ecuador. 2016. [Consulta: 09 octubre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4072/7/iniapscm105.pdf>

FANG, Y; et al. "Chemical and flavor profile changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during primary fermentation". *Food Science & Nutrition*, vol. 8, no. 8 (2020), (China) pp. 4121-4133. ISSN 2048-7177. DOI 10.1002/fsn3.1701.

FLORES, J. "Teobromina, el compuesto secreto del chocolate". *MuyInteresante.es* [en línea], 2017. [Consulta: 18 julio 2021]. Disponible en: <https://www.muyinteresante.es/innovacion/articulo/ique-es-la-teobromina>.

G.A.R WOOD & R.A LASS. *Cocoa*. 4th. ed. New York- USA: Wiley, 2008. E-ISBN: 9780470698426, 650 p.

GARCIA, E; et al. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. [en línea]. 2018. España: Universitat Politècnica de València [Consulta: 26 agosto 2021]. Disponible en:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>.

GBOGBRI, G.F. "Impact de la fermentation sur les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices du cacao". *Alimentation et Nutrition*. Université Montpellier, 2020, (Francia), 211 p. NNT: 2019MONTG005

GÓMEZ, J; et al. Catálogo de clones. En: *Grupo CONACADO* [en línea]. 2018. [Consulta: 28 octubre 2021]. Disponible en: https://equalexchange.coop/sites/default/files/CATALOGO_CLONES_FINAL_Enero25018.pdf.

GRASSIA, M; et al. "Polyphenols, methylxanthines, fatty acids and minerals in cocoa beans and cocoa products". *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 13, no. 3 (2019), (Italia) pp. 1721-1728. ISSN 2193-4126, 2193-4134. DOI 10.1007/s11694-019-00089-5.

GUTIÉRREZ, H; & DE LA VARA, R. *Análisis y diseño de experimentos*. 2ª ed. México: Mc Graw Hill, 2008. ISBN: 970-10-6526-3.

HERNÁNDEZ, C; et al. "Rapid screening of unground cocoa beans based on their content of bioactive compounds by NIR spectroscopy". *Food Control*, vol. 131, (2022), (México, España). ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2021.108347.

INEN 176. *Norma técnica ecuatoriana NTE INEN 176:2018 Granos de cacao. Requisitos* [en línea]. 2018. [Consulta: 26 agosto 2021]. Disponible en: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_176-5.pdf

INIAP. Programa nacional de cacao del INIAP desarrolla clones de cacao de alta productividad—Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2018. [Consulta: 19 junio 2021]. Disponible en: <http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/programa-nacional-de-cacao-del-iniap-desarrolla- clones-de-cacao-de-alta-productividad/>.

INIAP. "Programa de cacao y café de la Estación Experimental Portoviejo". Informe Técnico Anual. Manabí, Ecuador: INIAP, 2019. [Consulta: 27 octubre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5629/1/iniapeep2019CACAOYCAFE.pdf>.

INSTITUTO DE QUÍMICA APLICADA. Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (GC/MS), 2018. [Consulta: 19 junio 2021]. Disponible en: <https://www.uv.mx/sara/facilidades/gcms/>.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Norma Internacional ISO 9000:2015.* Sistemas de gestión de la calidad Fundamentos y vocabulario. [en línea]. 2015. [Consulta: 19 julio 2021]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/es/#iso:std:iso:9000:ed-4:v1:es>.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Norma Internacional ISO 2451:2017.* Cocoa beans Specification and quality requirements. [en línea]. 2017. [Consulta: 24 julio 2021]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:2451:ed-3:v1:en:sec:I>.

KRÄHMER, A; et al. "Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy". *Food Chemistry*, vol. 181, (2015), (Germany, Trinidad and Tobago) pp. 152-159. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.02.084.

KUKILNSKI, C. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural.* Barcelona- España: Omega, 2000. ISBN 84-282-1191-4.

LARES AMAIZ, M; et al. "Cambios de las propiedades físico-químicas y perfil de ácidos grasos en cacao de Chuao, durante el beneficio". *Agronomía Tropical* [en línea], 2013, (Venezuela, Ecuador) 63(1-2), pp. 37-47. [Consulta: 04 agosto 2021]. Disponible en: <http://ve.scielo.org/pdf/at/v63n1-2/art04.pdf>

LONDOÑO, J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad [en línea]. 2017. S.l.: Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos – GRIAL. [Consulta: 04 septiembre 2021]. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>.

LUCERO, M.G. Caracterización de la manteca de cacao de tres variedades Trinitario (CCN-51), Nacional (EET-103) y Forastero (IMC-67) [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 2014. [Consulta: 16 agosto 2021]. Disponible en: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/78/1/T-UTEQ-0001.pdf>

MAGAP. Ecuador es el primer exportador de cacao en grano de América, 2018. [Consulta: 22 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-es-el-primer-exportador-de-cacao-en-grano-de-america/>.

MARTÍNEZ, S. Cacao y café, alimentos ricos en fitoquímicos con propiedades beneficiosas en salud: estudios de biodisponibilidad de metilxantinas y efectos en salud en voluntarios sanos y con riesgo cardiovascular [en línea]. (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Complutense de Madrid, España. 2014. [Consulta: 14 noviembre 2021]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/28783/1/T35852.pdf>.

MINITAB 18. ¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples?, 2019. [Consulta: 30 octubre 2021]. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/what-is-tukey-s-method/>.

MIRANDA, A; & MARTÍN, O. Cromatografía Líquida (HPLC) [en línea]. 2017. [Consulta: 22 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases%20l%C3%ADquidos.pdf>.

MORALES, L.T. Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto vegetal obtenido de un cultivo comercial de Stevia rebaudiana ubicado en Olaya (Antioquia) [en línea] (Trabajo de titulación). (Biólogo) Universidad de Tolima, Colombia. 2017. [Consulta: 02 agosto 2021]. Disponible en: <http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/2430/1/T%200701%20429%20CD5824%20APROBADO%20LAURA%20TATIANA%20MORALES%20ORJUELA.pdf>

MORATALLA, R. "Neurobiología de las metilxantinas". *Trastornos Adictivos* [en línea], 2008, (España) 10(3), pp. 201-207. [Consulta: 14 noviembre 2021]. ISSN 1575-0973. DOI 10.1016/S1575-0973(08)76368-2. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-trastornos-adictivos-182-articulo-neurobiologia-metilxantinas-13128596>

MUÑOZ, G.C. Evaluación de la capacidad antioxidante en cacao Nacional fino de aroma (*Theobroma cacao L.*), de las principales zonas productoras del Ecuador [en línea]. (Trabajo de titulación). (Q. Alimentos) Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador. 2018. [Consulta: 31 octubre 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16722/1/T-UCE-0008-CQU-050.pdf>.

NARA, N; et al. "Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR". *Food Research International* [en línea], 2016, vol. 90, pp. 313-319. [Consulta: 24 julio 2021]. ISSN 0963-9969. Disponible en:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0963996916304537?token=A268846ECB59D33C5251D2A07323D81720D7A2CCB2285D422FED39A8A91DD523A490FCF082F7C181CD26EAFDE928F8EF&originRegion=us-east-1&originCreation=20220429013928>

NAZARIO, O; et al. "Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao L.*) criollo y siete clones". *Investigación y Amazonia* [en línea], 2014, (Perú) 3(1). [Consulta: 12 octubre 2021]. ISSN 2224-445X. Disponible en: <https://revistas.unas.edu.pe/index.php/revia/article/view/85/69>.

OMAR, S; et al. "Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de vitex doniana (Verbenacea)". *International Formulae Group*, vol. 9, no. 3 (2015), (Senegal) pp. 1263-1269. ISSN 1997-342X, 1991-8631.

ORACZ, J; & NEBESNY, E. "Antioxidant properties of cocoa beans (*Theobroma cacao L.*): Influence of cultivar and roasting conditions". *International Journal of Food Properties*, vol. 19, no. 6 (2016) pp. 1242-1258. ISSN 1094-2912, 1532-2386. DOI 10.1080/10942912.2015.1071840.

ORACZ, J; & ZYZELEWICZ, D. "In vitro antioxidant activity and FTIR characterization of high-molecular weight melanoidin fractions from different types of cocoa beans". *MDPI. Antioxidants*, vol. 8, no. 560 (2019). DOI 10.3390/antiox8110560

ORTIZ, J; et al. "Determinación de teobromina, catequina, capacidad antioxidante total y contenido fenólico total en muestras representativas de cacao amazónico boliviano y su comparación antes y después del proceso de fermentación". *Revista Boliviana de Química*, vol. 36, no. 1 (2019), (Bolivia) pp. 40-50. ISSN 0250-5460. DOI 10.34098/2078-3949.36.1.4.

PALLARES, A; et al. "Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) del clon CCN-51". *Respuestas*, vol. 21, no. 1 (2016), pp. 120-133. ISSN 2422-5053, 0122-820X. DOI 10.22463/0122820X.726.

PALMA. *Antioxidantes, ¿qué son y para qué sirven?* [blog]. 22 febrero 2018. [Consulta: 01 agosto 2021]. Disponible en: <https://fundaciondelcorazon.com/blog-impulso-vital/3250-antioxidantes-ique-son-y-para-que-sirven.html>.

PANIAGUA, Á. Obtención de taninos a partir de la pepita de uva [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad de Valladolid, España. 2015. [Consulta: 25 septiembre 2021]. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/14020/TFG-I-272.pdf;jsessionid=4EDD00A7C3E69FA388B142AEEE02BD74?sequence=1>.

PEDAN, V. Charakterisierung von oligomeren kakao proanthocyanidinen: Extraktion und chromatographische trennung mit simultaner bestimmung der antioxidativen kapazität [en línea]. (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universität Hamburg, Alemania. 2017. [Consulta: 25 septiembre 2021]. Disponible en: https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/7418/1/Zum_Druck.pdf.

PEDAN, V; et al. "HPTLC fingerprint profile analysis of cocoa proanthocyanidins depending on origin and genotype". *Food Chemistry*, vol. 267, (2018), pp. 277-287. ISSN 0308-8146. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.109>.

PELÁEZ, P; et al. "Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor". *Scientia Agropecuaria* [en línea], 2016a, (Perú) 7(4), pp. 355-365. [Consulta: 02 agosto 2021]. ISSN 20779917, 23066741. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v7n4/a01v7n4.pdf>

PELÁEZ, P; et al. "Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (Theobroma cacao) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes". *Scientia Agropecuaria* [en línea], 2016b, (Perú) 7(2), pp. 111-119. [Consulta: 02 agosto 2021]. ISSN 20779917, 23066741. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1105/1034>

PEREA, J.A. *El cacao desde la ciencia: de la semilla al chocolate*. [en línea]. Bucaramanga-Colombia: Ediciones UIS, 2019. ISBN 978-1-5129-8240-4. [Consulta: 02 agosto 2021]. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/epoch/129274?page=24>.

PEREA, J.A., et al. "El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento". *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud* [en línea], 2009, (Colombia) 41(2), pp. 128-134. [Consulta: 31 octubre 2021]. ISSN 0121-0807. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3438/343835695003.pdf>

PÉREZ, Mi. Á. Guía de buenas prácticas de cosecha, fermentación y secado para la producción de cacaos especiales [en línea]. 2017. S.l.: Swisscontact. [Consulta: 21 agosto 2021]. Disponible

en:

https://www.swisscontact.org/_Resources/Persistent/d/3/b/f/d3bfb5a8d042f05cbf5533494e288f2c52800b8/Guia_de_buenas_practicas_de_poscosecha.pdf.

PERONE, J. Volatile & nonvolatile solutes, 2018. [Consulta: 30 junio 2021]. Disponible en: <https://study.com/academy/lesson/volatile-nonvolatile-solutes.html>.

PORTILLO, E; et al. "Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao L.*) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela". *Revista UDO Agrícola* [en línea], 2009, (Venezuela) 92(2), pp. 458-468 [Consulta: 02 agosto 2021]. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09058>

PORTILLO, D. Efecto del procesado en el contenido y perfil de polifenoles de cacao [en línea]. (Trabajo de titulación). (Maestría) Universitat Politècnica de València, España. 2017. [Consulta: 24 septiembre 2021]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/89316/PORTILLO%20-%20EFECTO%20DEL%20PROCESADO%20EN%20EL%20CONTENIDO%20Y%20PERFIL%20DE%20POLIFENOLES%20DE%20CACAO.pdf?sequence=1>.

QUIDEAU, S; et al. "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis". *Angewandte Chemie International Edition* [en línea], 2011, 50(3), pp. 586-621. [Consulta: 02 agosto 2021]. ISSN 14337851. Disponible en: <http://agri.ckcest.cn/ass/NK003-20151207001.pdf>

QUISPE, L.J. Teobromina, cafeína y catequinas, en granos de cacao de Pucacaca y Huingoyacu e influencia del cacao CCN-51 y del beneficio [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Perú. 2013. [Consulta: 06 septiembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/294/FIA-210.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

RAMÍREZ, M.B; et al. "Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao L.*) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas, México". *Perspectivas en Nutrición Humana* [en línea], 2013, (Colombia) 15(1), pp. 27-40. [Consulta: 03 noviembre 2021]. ISSN 0124-4108. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/penh/v15n1/v15n1a2.pdf>

RE, R; et al. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radical Biology and Medicine* [en línea], 1999, 26(9), pp. 1231-1237. [Consulta: 02

agosto 2021]. ISSN 0891-5849. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998003153>

RIAÑO, N; et al. "Contenido de grasa total, perfil de ácidos grasos y triglicéridos proveniente de cacao finos de aroma: Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela". *Vitae* [en línea], 2016, 23(1), pp. s226-s230. [Consulta: 21 septiembre 2021]. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/314687800>

RIOJA, A.P; et al. "Determinación de la capacidad antioxidante total, fenoles totales, y la actividad enzimática en una bebida no láctea en base a granos de chenopodium quinoa". *Revista Boliviana de Química* [en línea], 2018, (Bolivia, Suecia) 35(5), pp. 168-176. [Consulta: 16 agosto 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/4263/426358213006/html/index.html>

RIVAROLA, E.M; & DI FABIO, A. Compuestos fenólicos, actividad antioxidante. Bases farmacológicas y su aplicación en medicina general y oral [en línea]. 2018. S.l.: Investigación: Área estomatología de la UNCuyo. [Consulta: 17 septiembre 2021]. Disponible en: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/6654/rivarolarfo-312009.pdf.

RIVAS, B.N; et al. "Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en extractos de cuatro especies de orégano". *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia* [en línea], 2017, (Venezuela) 40(3), pp. 134-142. [Consulta: 23 septiembre]. ISSN 0254-0770. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0254-07702017000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

RIVERA, R.D; et al., "Efecto del tipo y tiempo de fermentación en la calidad física y química del cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo Nacional". *Ciencia y Tecnología* [en línea], 2012, (Ecuador) 5(1), pp. 7-12. [Consulta: 21 agosto 2021]. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/2416>

RODRÍGUEZ, J; et al. "Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis". *Food Research International* [en línea], 2011, 44(1), pp. 250-258. [Consulta: 13 septiembre 2021]. ISSN 09639969. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996910004035?via%3Dihub>

RODRIGUEZ, J; et al. "Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa". *Food chemistry* [en línea], 2012, 132(1), pp. 277-288. [Consulta: 25

septiembre 2021]. ISSN 0308-8146. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814611015317?via%3Dihub>

RODRÍGUEZ, N.A. Caracterización cualitativa y cuantitativa de polifenoles en semillas crudas de ocho accesiones de diferentes genotipos de *Theobroma cacao L* en el Salvador [en línea]. (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Universidad de El Salvador, El Salvador. 2019. [Consulta: 16 octubre 2021]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/20154/1/16103758.pdf>.

RUÍZ, M.L. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de gases [en línea]. 2020. Colombia: Universidad Simón Bolívar. [Consulta: 23 noviembre 2021]. Disponible en:
<https://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/20.500.12442/7985/Gu%C3%ADa%20de%20Cromatograf%C3%ADa%20liquida%20de%20alto%20rendimiento%28HPLC%29%20y%20Cromatograf%C3%ADa%20de%20gases%20%28CG%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

S. ORDOÑEZ, E; et al. "Quantification of total polyphenols and antioxidant capacity in skins and seeds from cacao (*Theobroma cacao L.*), tuna (*Opuntia ficus indica Mill*), grape (*Vitis Vinífera*) and uvilla (*Pourouma cecropiifolia*)". *Scientia Agropecuaria* [en línea], 2019, (Perú) 10(2), pp. 175-183. [Consulta: 21 agosto 2021]. ISSN 2077-9917. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172019000200003&script=sci_abstract&tlng=en

SAMANIEGO, I.R; et al. "Effect of the growing area on the methylxanthines and flavan-3-ols content in cocoa beans from Ecuador". *Journal of Food Composition and Analysis* [en línea], 2020, (Ecuador) vol. 88, pp. 1034-48. [Consulta: 04 septiembre 2021]. ISSN 0889-1575. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157519308786?via%3Dihub>

SAMANIEGO, I.R; et al. "Effect of the growing area on the fat content and the fatty acid composition of ecuadorian cocoa beans". *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 72, no 7 (2021), pp. 901-911. ISSN 0963-7486, 1465-3478. DOI 10.1080/09637486.2021.1884204.

SAMANIEGO, I.R. Estudio de los principales componentes químicos no volátiles asociados a la calidad del cacao "Nacional" de Ecuador, como herramienta en la certificación de origen. (Trabajo de titulación). (Doctorado) Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia-España. 2020. DOI 10.31428/10317/9130

SÁNCHEZ, V.A. Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao L.*), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 2007. [Consulta: 02 agosto 2021]. Disponible en: <http://cadenacacaoca.info/CDOC-Deployment/documentos/Caracterizaci0n.pdf>.

SÁNCHEZ, A. Características antioxidantes de propóleos de diferentes orígenes geográficos [en línea]. (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Universitat Politècnica de València, España. 2018. [Consulta: 11 octubre 2021]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/109879/S%C3%A1nchez%20-%20Caracter%20C3%ADsticas%20antioxidantes%20de%20prop%C3%B3leos%20de%20diferentes%20or%C3%ADgenes%20geogr%C3%A1ficos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

SERVENT, A; et al. "Assessment of cocoa (*Theobroma cacao L.*) butter content and composition throughout fermentations". *Food Research International*, vol. 107, (2018), pp. 675-682. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2018.02.070.

SERVICIO DE ACREDITACIÓN ECUATORIANO. La producción de cacao en Ecuador puede mejorar su calidad gracias a la ISO 2451, 2018. [Consulta: 02 junio 2021]. Disponible en: <https://www.acreditacion.gob.ec/cacao-en-ecuador-mejora-su-calidad/>.

STEINBERG, F.M; et al. "Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health". *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 103, no. 2 (2003), pp. 215-23. DOI 10.1053/jada.2003.50028.

TORO, S; et al. "Food-safe process for high recovery of flavonoids from cocoa beans: Antioxidant and HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis". *Antioxidants*, vol. 9, no. 5 (2020), pp. 364. ISSN 2076-3921. DOI 10.3390/antiox9050364.

TRADERS.STUDIO. ANOVA de 2 vías [en línea]. 1 febrero 2021. [Consulta: 30 octubre 2021]. Disponible en: <https://traders.studio/anova-de-2-vias/>.

URBAŃSKA, B; & KOWALSKA, J. "Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world". *Antioxidants*, vol. 8, no. 8 (2019), (Polonia) pp. 283. ISSN 2076-3921. DOI 10.3390/antiox8080283.

VÁZQUEZ, A; et al. "Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* [en línea], 2016, (México) 66(3), pp. 239-254. [Consulta: 29 agosto 2021]. ISSN 0004-0622. Disponible en: <http://ve.scielo.org/pdf/alan/v66n3/art10.pdf>

VERA B., J; et al. "Descripción técnica de algunos híbridos y clones de cacao recomendados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)". Comunicación Técnica No 12 de la Estación Experimental Pichilingue, Ecuador: INIAP, 1984. [Consulta: 27 octubre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1602/1/Comunicaci%C3%B3n%20T%C3%A9cnica%20N%C2%BA%2012.pdf>

VERA, J; et al. "Atributos físicos-químicos y sensoriales de las almendras de quince clones de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) en el Ecuador". *Ciencia y Tecnología* [en línea], 2014, (Ecuador) 7(2), pp. 21-34. [Consulta: 19 noviembre 2021]. ISSN 1390-4043. Disponible en: https://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_en%20construccion.pdf

VERDESOTO, P.S. Caracterización química preliminar de cacao (*Theobroma cacao*) de los municipios de Omoa y La Masica, Honduras [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Zamorano, Honduras. 2009. [Consulta: 02 agosto 2021]. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/316/1/AGI-2009-T045.pdf>.

WAKAO, H. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio [en línea]. (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito-Ecuador. 2002. [Consulta: 25 septiembre 2021]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=x4AzAQAAMAAJ&pg=PA54&lpg=PA54&dq=M%C3%A9todo+Oficial+980.14+de+la+AOAC+\(1995\)+alcaloides&source=bl&ots=QcppUd6E5u&sig=ACfU3U1FNiTCYV8PS1RBtDK1YW_NJXC29g&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwih9P3U5ZDyAhXkRDABHQ3hD0gQ6AEwBXoEAcQA#w=onpage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=x4AzAQAAMAAJ&pg=PA54&lpg=PA54&dq=M%C3%A9todo+Oficial+980.14+de+la+AOAC+(1995)+alcaloides&source=bl&ots=QcppUd6E5u&sig=ACfU3U1FNiTCYV8PS1RBtDK1YW_NJXC29g&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwih9P3U5ZDyAhXkRDABHQ3hD0gQ6AEwBXoEAcQA#w=onpage&q&f=false)

WOLLGAST, J; & ANKLAM, E. "Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification". *Food Research International*, vol. 33, no. 6 (2000), pp. 423-447. ISSN 0963-9969. DOI 10.1016/S0963-9969(00)00068-5.

YANZAPANTA, A.G. Estudio de la variación de los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y grasa en almendras de cacao fino de aroma en tres diferentes zonas de producción de la amazonia ecuatoriana [en línea]. (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. 2014. [Consulta: 08 agosto 2021]. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8467/1/AL%20531.pdf>.

ZAMBRANO, A; et al. "Caracterización de parámetros físicos de calidad en almendras de cacao criollo, trinitario y forastero durante el proceso de secado". *Agronomía Tropical* [en línea], 2010, (Venezuela), 60(4). pp.389-396. [Consulta: 02 agosto 2021]. ISSN 0002-192X. Disponible en: <http://ve.scielo.org/pdf/at/v60n4/art09.pdf>

ZAPATA, S; et al. "Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano". *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [en línea], 2013, (Colombia) 18(3), pp. 391-404. [Consulta: 01 agosto 2021]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v18n3/pla07313.pdf>

ZHISHEN, J; et al. "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". *Food Chemistry*, vol. 64, no. 4 (1999), pp. 555-559. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/S0308-8146(98)00102-2.



ANEXOS

ANEXO A: CONTENIDO DE CQNV (GRASA, COMPUESTOS FENÓLICOS, METILXANTINAS) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

Factores			Respuestas experimentales												
MS	NF	R	H %	G (g grasa /100g)	PT (mg ác. gálico/g)	FT (mg CAT/g)	CAT (mg CAT/g)	EPI (mg EPI/g)	PC-B2 (mg PC-B2/g)	PC-C1 (mg PC-C1/g)	ABTS (μmol Trolox/g)	FRAP (μmol Trolox/g)	TBR (g TBR/100g)	CAF (g CAF/100g)	TBR/CAF
EEB-8	D ₀	R1	5,60	49,34	70,88	120,54	7,68	11,73	10,31	16,04	1269,99	998,00	2,30	0,31	7,98
EEB-8	D ₀	R2	5,60	48,88	70,40	123,70	7,52	11,46	10,34	15,70	1268,19	931,54	2,34	0,33	7,59
EEB-8	D ₄	R1	6,35	50,13	32,27	44,93	1,29	1,42	6,00	2,80	549,67	526,54	1,84	0,30	6,45
EEB-8	D ₄	R2	6,35	49,83	32,24	42,12	1,24	1,38	5,88	2,78	542,40	528,35	1,85	0,32	6,22
CCNC-262M	D ₀	R1	6,08	47,58	62,35	106,18	8,22	6,10	8,66	11,38	877,78	832,88	1,85	0,29	6,84
CCNC-262M	D ₀	R2	6,08	47,27	59,04	99,87	7,76	5,93	8,58	11,21	852,63	861,77	1,91	0,28	7,21
CCNC-262M	D ₄	R1	6,79	47,79	30,97	45,95	4,67	0,63	0,88	2,39	499,74	520,71	1,19	0,28	4,60
CCNC-262M	D ₄	R2	6,79	47,46	32,21	46,34	4,88	0,63	0,86	2,47	500,62	516,01	1,26	0,25	5,40
CCN-51	D ₀	R1	5,09	49,66	91,08	112,13	5,03	12,01	10,96	20,62	1305,67	1038,07	1,84	0,24	8,06
CCN-51	D ₀	R2	5,09	49,77	88,02	117,61	5,00	12,07	11,20	20,43	1351,77	1083,32	1,84	0,31	6,33
CCN-51	D ₄ *	R1	6,06	51,11	38,16	47,17	1,03	1,67	1,55	4,48	561,63	349,41	1,41	0,22	6,85
CCN-51	D ₄ *	R2	6,06	51,46	36,01	48,37	0,98	1,65	1,48	4,41	567,71	352,62	1,36	0,23	6,34
CCNC-037L	D ₀	R1	7,59	46,92	73,11	108,59	2,76	7,26	6,71	10,28	1179,88	762,23	1,26	0,26	5,26
CCNC-037L	D ₀	R2	7,01	46,31	70,69	105,71	2,81	7,15	6,62	10,10	1102,17	717,28	1,24	0,26	5,07
CCNC-037L	D ₄	R1	7,29	47,88	30,73	49,47	0,73	0,98	0,63	1,34	364,87	327,38	1,10	0,25	4,78
CCNC-037L	D ₄	R2	7,20	47,77	29,28	49,66	0,77	1,18	0,67	1,60	378,93	328,60	1,11	0,25	4,86
EET-103	D ₀	R1	6,70	46,32	56,01	108,48	7,73	5,26	5,59	10,15	877,86	605,88	1,86	0,36	5,56

EET-103	D ₀	R2	6,50	45,37	55,14	103,47	8,00	5,13	5,70	10,04	920,41	641,05	1,85	0,35	5,72
EET-103	D ₄	R1	7,46	47,01	31,09	47,88	1,37	0,94	0,57	1,50	440,48	281,46	1,67	0,35	5,19
EET-103	D ₄	R2	7,38	47,08	30,73	47,41	1,58	0,99	0,77	1,52	450,67	284,93	1,70	0,35	5,30
ICS-95	D ₀	R1	5,57	53,07	134,49	208,05	9,21	15,40	10,68	27,72	1892,14	1883,37	1,86	0,48	4,07
ICS-95	D ₀	R2	5,57	53,07	127,47	217,04	8,71	13,05	10,40	23,79	1950,01	1894,89	1,79	0,47	4,05
ICS-95	D ₄	R1	6,72	54,81	50,90	66,52	5,70	2,17	1,90	4,66	802,94	504,04	1,52	0,43	3,78
ICS-95	D ₄	R2	6,71	55,26	50,59	62,96	5,65	2,15	1,85	4,64	799,19	475,83	1,47	0,42	3,73

MS: Material Seleccionado; R: repetición; N.F: nivel de fermentación; D₀: Sin fermentar, D₄: Fermentado por 4 días y D₄*: fermentado por 5 días.

H: humedad; G: grasa; PT: polifenoles totales; FT: flavonoides totales; CAT: catequina; EPI epicatequina; PC-B2 y PC-C1: procianidina B2 y C1; ABTS y FRAP: actividad antioxidante; TBR y CAF: teobromina y cafeína (metilxantinas). Resultados expresados en base seca (BS).

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO B: CONTENIDOS PROMEDIO DE CQNV (GRASA, COMPUESTOS FENÓLICOS, METILXANTINAS) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR

I		V												
MS	N.F	G (g grasa /100g)	PT (mg ác. gálico/g)	FT (mg CAT/g)	CAT (mg CAT/g)	EPI (mg EPI/g)	PC-B2 (mg PC-B2/g)	PC-C1 (mg PC-C1/g)	ABTS (μmol Trolox/g)	FRAP (μmol Trolox/g)	TBR (g TBR/ 100g)	CAF (g CAF/ 100g)	TBR/ CAF	
EEB-8	D ₀	1	49,11 ± 0,33	70,64 ± 0,34	122,12 ± 2,23	7,60 ± 0,11	11,60 ± 0,19	10,33 ± 0,02	15,87 ± 0,24	1269,09 ± 1,27	964,77 ± 46,99	2,32 ± 0,03	0,32 ± 0,01	7,79 ± 0,28
	D ₄	2	49,98 ± 0,21	32,26 ± 0,02	43,53 ± 1,99	1,27 ± 0,04	1,40 ± 0,03	5,94 ± 0,08	2,79 ± 0,01	546,04 ± 5,14	527,45 ± 1,28	1,85 ± 0,01	0,31 ± 0,01	6,34 ± 0,16
CCNC-	D ₀	3	47,43 ± 0,22	60,70 ± 2,34	103,03 ± 4,46	7,99 ± 0,33	6,02 ± 0,12	8,62 ± 0,06	11,30 ± 0,12	865,21 ± 17,78	847,33 ± 20,43	1,88 ± 0,04	0,29 ± 0,01	7,03 ± 0,26
262M	D ₄	4	47,63 ± 0,23	31,59 ± 0,88	46,15 ± 0,28	4,78 ± 0,15	0,63 ± 0,00	0,87 ± 0,01	2,43 ± 0,06	500,18 ± 0,62	518,36 ± 3,32	1,23 ± 0,05	0,27 ± 0,02	5,00 ± 0,57
CCN- 51	D ₀	5	49,72 ± 0,08	89,55 ± 2,16	114,87 ± 3,87	5,02 ± 0,02	12,04 ± 0,04	11,08 ± 0,17	20,53 ± 0,13	1328,72 ±	1060,70 ±	1,84 ± 0,00	0,28 ± 0,05	7,20 ± 1,22
	D ₄		6	51,29 ± 0,25	37,09 ± 1,52	47,77 ± 0,85	1,01 ± 0,04	1,66 ± 0,01	1,52 ± 0,05	4,45 ± 0,05	564,67 ± 4,30	351,02 ± 2,27	1,39 ± 0,04	0,23 ± 0,01

CCNC-037L	D ₀	7	46,62 ± 0,43	71,90 ± 1,71	107,15 ± 2,04	2,79 ± 0,04	7,21 ± 0,08	6,67 ± 0,06	10,19 ± 0,13	1141,03 ± 54,95	739,76 ± 31,78	1,25 ± 0,01	0,26 ± 0,00	5,17 ± 0,13
	D ₄	8	47,83 ± 0,08	30,01 ± 1,03	49,57 ± 0,13	0,75 ± 0,03	1,08 ± 0,14	0,65 ± 0,03	1,47 ± 0,18	371,90 ± 9,94	327,99 ± 0,86	1,11 ± 0,01	0,25 ± 0,00	4,82 ± 0,06
EET-103	D ₀	9	45,80 ± 0,61	55,58 ± 0,62	105,98 ± 3,54	7,87 ± 0,19	5,20 ± 0,09	5,65 ± 0,08	10,10 ± 0,08	899,14 ± 30,09	623,47 ± 34,87	1,86 ± 0,01	0,36 ± 0,01	5,64 ± 0,11
	D ₄	10	47,04 ± 0,52	30,91 ± 0,25	47,65 ± 0,33	1,48 ± 0,15	0,97 ± 0,04	0,67 ± 0,14	1,51 ± 0,01	445,58 ± 7,21	283,20 ± 2,45	1,69 ± 0,02	0,35 ± 0,00	5,25 ± 0,08
ICS-95	D ₀	11	53,07 ± 0,00	130,98 ± 4,96	212,55 ± 6,36	8,96 ± 0,35	14,23 ± 1,66	10,54 ± 0,20	25,76 ± 2,78	1921,08 ± 40,92	1889,13 ± 8,15	1,82 ± 0,05	0,48 ± 0,01	4,06 ± 0,01
	D ₄	12	55,04 ± 0,32	50,75 ± 0,22	64,74 ± 2,52	5,68 ± 0,04	2,16 ± 0,01	1,88 ± 0,04	4,65 ± 0,01	801,07 ± 2,65	489,94 ± 19,95	1,50 ± 0,04	0,43 ± 0,01	3,76 ± 0,04

V: variables; I: individuos. Los resultados están expresados como el promedio de dos réplicas (n=2) ± desviación estándar (SD). Resultados expresados en base seca (BS)

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO C: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE G EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

	FV	SC	GL	CM	Fo	Valor -p
G	MS	183,66	5	36,73	601	0,000000
	NF	17,86	1	17,86	292	0,000000
	MS * NF	15,01	5	3	49	0,000000
	Error	0,73	12	0,06		

Realizado por: Toaquiza Valeria; Samaniego Iván, 2021.

ANEXO D: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE PT EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR

	FV	SC	GL	CM	Fo	Valor -p
PT	MS	12124,1	5	1246,92	352,36	0,000000
	NF	36237,6	1	11859,45	3351,26	0,000000
	MS * NF	6240,50	5	402,90	113,85	0,000000
	Error	108,2	12	3,54		

Realizado por: Toaquiza Valeria; Samaniego Iván, 2021

ANEXO E: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE FT EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

	FV	SC	GL	CM	Fo	Valor -p
FT	MS	12124,1	5	2424,8	268,98	0,000000
	NF	36237,6	1	36237,6	4019,72	0,000000
	MS * NF	6240,50	5	1248,10	138,45	0,000000
	Error	108,2	12	9		

Realizado por: Toaquiza Valeria; Samaniego Iván, 2021

ANEXO F: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE CAT, EPI, PC-B2 Y PC-C1 EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

	FV	SC	GL	CM	Fo	Valor -p
CAT	MS	84,6031	5	16,9206	623,77	0,000000
	NF	106,3779	1	106,3779	3921,6	0,000000
	MS * NF	15,92	5	3,18	117,4	0,000000
	Error	0,3255	12	0,0271		
EPI	MS	89,5398	5	17,908	75,289	0,000000
	NF	390,0581	1	390,0581	1639,891	0,000000
	MS * NF	51,52	5	10,3	43,316	0,000000
	Error	2,8543	12	0,2379		
PC-B2	MS	69,6188	5	13,9238	1475,9	0,000000
	NF	284,9138	1	284,9138	30200,41	0,000000
	MS * NF	21,72	5	4,34	460,55	0,000000
	Error	0,1132	12	0,0094		

PC-C1	MS	300,646	5	60,129	91,626	0,000000
	NF	973,372	1	973,372	1483,238	0,000000
	MS * NF	129,69	5	25,94	39,524	0,000000
	Error	7,875	12	0,656		

Realizado por: Toaquiza Valeria; Samaniego Iván, 2021.

ANEXO G: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (ABTS Y FRAP) EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

	FV	SC	GL	CM	Fo	Valor -p
ABTS	MS	1334313	5	266863	445,84	0,000000
	NF	2932766	1	2932766	4899,68	0,000000
	MS * NF	358755,00	5	71751,00	119,87	0,000000
	Error	7183	12	599		
FRAP	MS	1334313	5	266863	445,84	0,000000
	NF	2932766	1	2932766	4899,68	0,000000
	MS * NF	358755,00	5	71751,00	119,87	0,000000
	Error	7183	12	599		

Realizado por: Toaquiza Valeria; Samaniego Iván, 2021.

ANEXO H: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) BIFACTORIAL AL 95% DE CONFIANZA PARA EL CONTENIDO DE TBR y CAF EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO FERMENTADO Y SIN FERMENTAR.

	FV	SC	GL	CM	Fo	Valor -p
TBR	MS	1,72673	5	0,34535	411,89	0,000000
	NF	0,83126	1	0,83126	991,43	0,000000
	MS * NF	0,2	5	0,04	46,87	0,000000
	Error	0,01006	12	0,00084		
CAF	MS	0,117699	5	0,02354	92,054	0,000000
	NF	0,003467	1	0,003467	13,56	0,003135
	MS * NF	0	5	0	1,69	0,211454
	Error	0,003069	12	0,000256		

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO I: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE G EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a						
MS	NF	1	2	3	4	5	6	7
EET-103	D0	45,80						
CCNC-037L	D0	46,62	46,62					
EET-103	D4		47,04	47,04				
CCNC-262M	D0		47,43	47,43				
CCNC-262M	D4		47,63	47,63				
CCNC-037L	D4			47,83				
EEB-8	D0				49,11			
CCN-51	D0				49,72			
EEB-8	D4				49,98			
CCN-51	D4*					51,29		
ICS-95	D0						53,07	
ICS-95	D4							55,04
Sig.		0,275	0,102	0,321	0,210	1,000	1,000	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO J: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE PT EN MUESTRAS SELECCIONADAS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a					
MS	NF	1	2	3	4	5	6
CCNC-037L	D4	30,01					
EET-103	D4	30,91					
CCNC-262M	D4	31,59					
EEB-8	D4	32,26					
CCN-51	D4*	37,09					
ICS-95	D4		50,75				
EET-103	D0		55,58	55,58			
CCNC-262M	D0			60,70			
EEB-8	D0				70,64		
CCNC-037L	D0				71,90		
CCN-51	D0					89,55	
ICS-95	D0						130,98
Sig.		0,069	0,385	0,317	1,000	1,000	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO K: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE FT EN MUESTRAS SELECCIONADAS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a				
MS	NF	1	2	3	4	5
EEB-8	D4	43,53				
CCNC-262M	D4	46,15				
EET-103	D4	47,65				
CCN-51	D4*	47,77				
CCNC-037L	D4	49,57				
ICS-95	D4		64,74			
CCNC-262M	D0			103,03		
EET-103	D0			105,98		
CCNC-037L	D0			107,15		
CCN-51	D0			114,87	114,87	
EEB-8	D0				122,12	
ICS-95	D0					212,55
Sig.		0,681	1,000	0,052	0,460	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO L: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE CAT EN MUESTRAS SELECCIONADAS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a						
MS	NF	1	2	3	4	5	6	7
CCNC-037L	D4	0,75						
CCN-51	D4*	1,01	1,01					
EEB-8	D4	1,27	1,27					
EET-103	D4		1,48					
CCNC-037L	D0			2,79				
CCNC-262M	D4				4,78			
CCN-51	D0				5,016			
ICS-95	D4					5,68		
EEB-8	D0						7,60	
EET-103	D0						7,87	
CCNC-262M	D0						7,99	
ICS-95	D0							8,96
Sig.		0,188	0,274	1,000	0,930	1,000	0,494	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO M: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE EPI EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a				
MS	NF	1	2	3	4	5
CCNC-262M	D4	0,63				
EET-103	D4	0,97				
CCNC-037L	D4	1,08				
EEB-8	D4	1,40				
CCN-51	D4*	1,66				
ICS-95	D4	2,16				
EET-103	D0		5,20			
CCNC-262M	D0		6,02	6,02		
CCNC-037L	D0			7,21		
EEB-8	D0				11,60	
CCN-51	D0				12,04	
ICS-95	D0					14,23
Sig.		0,178	0,847	0,446	0,997	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO N: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE PC-B2 EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a						
MS	NF	1	2	3	4	5	6	7
CCNC-037L	D4	0,65						
EET-103	D4	0,67						
CCNC-262M	D4	0,87						
CCN-51	D4*		1,52					
ICS-95	D4		1,88					
EET-103	D0			5,65				
EEB-8	D4			5,94				
CCNC-037L	D0				6,67			
CCNC-262M	D0					8,62		
EEB-8	D0						10,33	
ICS-95	D0						10,54	
CCN-51	D0							11,08
Sig.		0,542	0,076	0,208	1,000	1,000	0,571	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO O: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE PC-C1 EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a				
MS	NF	1	2	3	4	5
CCNC-037L	D4	1,47				
EET-103	D4	1,51				
CCNC-262M	D4	2,43				
EEB-8	D4	2,79				
CCN-51	D4*	4,45				
ICS-95	D4	4,65				
EET-103	D0		10,10			
CCNC-037L	D0		10,19			
CCNC-262M	D0		11,30			
EEB-8	D0			15,87		
CCN-51	D0				20,53	
ICS-95	D0					25,76
Sig.		0,054	0,920	1,000	1,000	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO P: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR ABTS EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a							
MS	NF	1	2	3	4	5	6	7	8
CCNC-037L	D4	371,90							
EET-103	D4	445,58	445,58						
CCNC-262M	D4		500,18	500,18					
EEB-8	D4			546,04					
CCN-51	D4*			564,67					
ICS-95	D4				801,07				
CCNC-262M	D0				865,21	865,21			
EET-103	D0					899,14			
CCNC-037L	D0						1141,03		
EEB-8	D0							1269,09	
CCN-51	D0							1328,72	
ICS-95	D0								1921,08
Sig.		0,214	0,558	0,354	0,360	0,946	1,000	0,449	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO Q: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR FRAP EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a							
MS	NF	1	2	3	4	5	6	7	8
EET-103	D4	283,20							
CCNC-037L	D4	327,99							
CCN-51	D4*	351,02							
ICS-95	D4		489,94						
CCNC-262M	D4		518,36						
EEB-8	D4		527,45						
EET-103	D0			623,45					
CCNC-037L	D0				739,76				
CCNC-262M	D0					847,33			
EEB-8	D0						964,77		
CCN-51	D0							1060,70	
ICS-95	D0								1889,13
Sig.		0,190	0,834	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO R: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE TBR EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

		HSD Tukey ^a					
MS	NF	1	2	3	4	5	6
CCNC-037L	D4	1,11					
CCNC-262M	D4		1,23				
CCNC-037L	D0		1,25				
CCN-51	D4*			1,39			
ICS-95	D4			1,50			
EET-103	D4				1,685		
ICS-95	D0					1,8250	
CCN-51	D0					1,8400	
EEB-8	D4					1,8450	
EET-103	D0					1,8550	
CCNC-262M	D0					1,8800	
EEB-8	D0						2,3200
Sig.		1,000	0,999	0,080	1,000	0,776	1,000

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO S: PRUEBA DE TUKEY ($\alpha=0,05$) PARA EL CONTENIDO DE CAF EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO.

MS	NF	HSD Tukey ^a					
		1	2	3	4	5	6
CCN-51	D4*	0,2250					
CCNC-037L	D4	0,2500	0,2500				
CCNC-037L	D0	0,2600	0,2600	0,2600			
CCNC-262M	D4	0,2650	0,2650	0,2650			
CCN-51	D0	0,2750	0,2750	0,2750			
CCNC-262M	D0	0,2850	0,2850	0,2850	0,2850		
EEB-8	D4		0,3100	0,3100	0,3100	0,3100	
EEB-8	D0			0,3200	0,3200	0,3200	
EET-103	D4				0,3500	0,3500	
EET-103	D0					0,3550	
ICS-95	D4						0,4250
ICS-95	D0						0,4750
Sig.		0,106	0,106	0,106	0,067	0,362	0,248

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

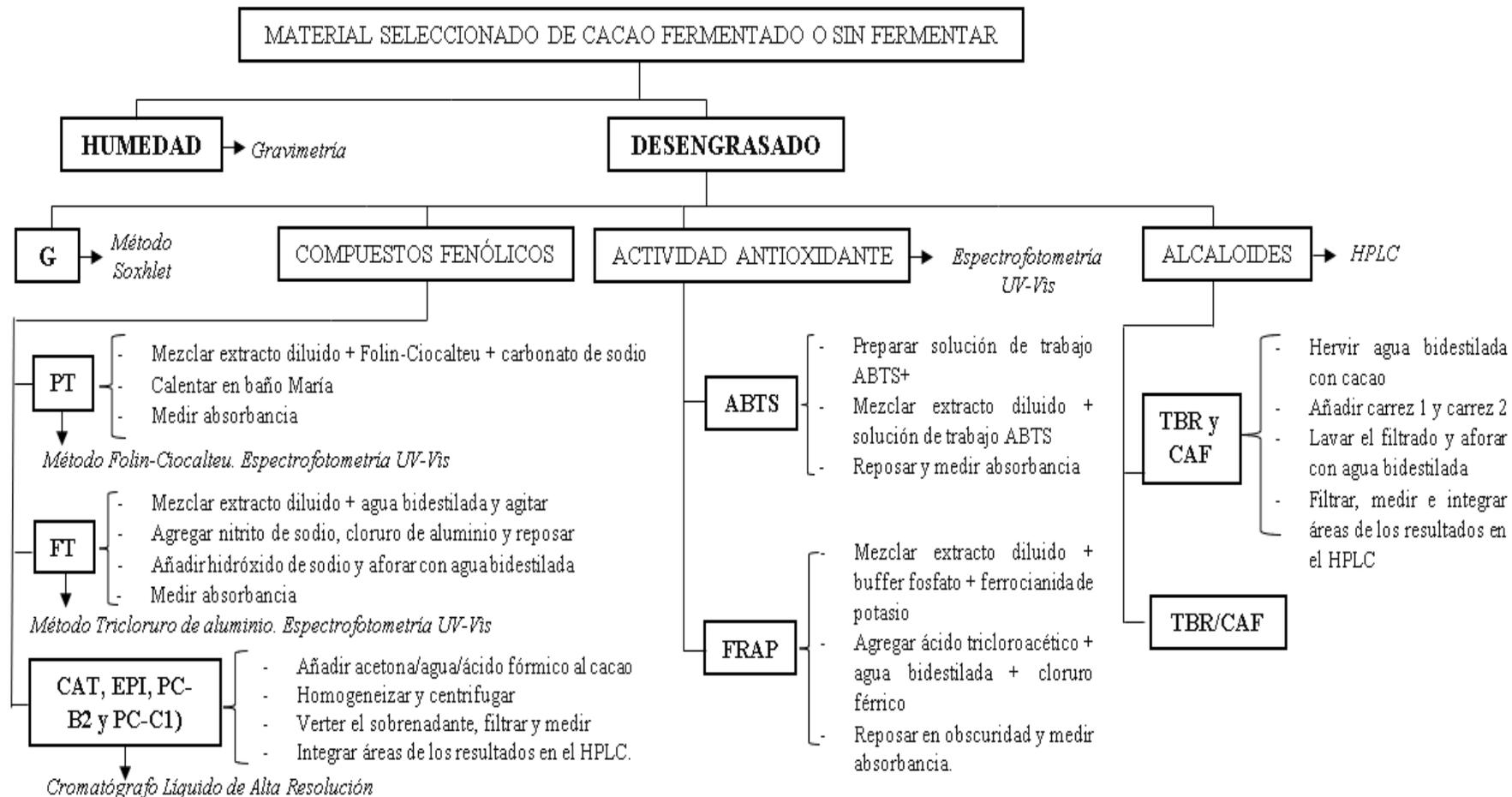
ANEXO T: FLUJOGRAMA PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE GRANOS DE CACAO SELECCIONADO. PRIMERA ETAPA: PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA.



D0: sin fermentar; D4: fermentado por 4 días; D4*: fermentado por 5 días (sólo el material seleccionado CCN-51).

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

**ANEXO U: FLUJOGRAMA PARA EL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES EN MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO.
SEGUNDA ETAPA: ANÁLISIS DE COMPUESTOS QUÍMICOS NO VOLÁTILES.**



G: grasa; PT: polifenoles totales; FT: flavonoides totales; CAT: catequina; EPI epicatequina; PC-B2 y PC-C1: procianidina B2 y C1; ABTS y FRAP: actividad antioxidante; TBR y CAF: teobromina y cafeína (metilxantinas).

Realizado por: Toaquiza Valeria, 2021.

ANEXO V: PRETRATAMIENTO: PELADO Y MOLIDO (MOLINO ULTRA-CENTRÍFUGO ZM 200) DE MUESTRAS DE CACAO SELECCIONADO.



ANEXO W: (A) DESENGRASADO EN EQUIPO SOXHLET (B) EXTRACCIÓN Y SECADO DEL CACAO DESENGRASADO (C) DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA.



A)

B)

C)

ANEXO X: (A) PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO EN LOS DIFERENTES CACAOS; (B) ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS; (C) CUANTIFICACIÓN DE PT EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS.



A)



B)



C)

ANEXO Y: (A) Y (B) ADICIÓN DE AlCl_3 E NaOH EN EXTRACTOS DE CACAO; (C) CUANTIFICACIÓN DE FT EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS.



A)



B)



C)

ANEXO Z: (A) ADICIÓN DE ACETONA/AGUA/ÁCIDO FÓRMICO A CACAOS DESENGRASADOS; (B) PREPARACIÓN DE MUESTRAS EN HOMOGENIZADOR DE SOBREMESA (FASTPREP-24™ CLASSIC INSTRUMENT) Y CENTRÍFUGA REFRIGERADA (SIGMA 4-16KS); (C) FILTRACIÓN DE MUESTRAS PARA CUANTIFICAR CAT, EPI, PC-B2 Y PC-C1 EN HPLC.



A)

B)

C)

ANEXO AA: (A) PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ACTIVADA ABTS⁺; (B) ADICIÓN DE ABTS A EXTRACTOS DE CACAO (C) DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR ABTS EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS.



A)

B)

C)

ANEXO BB: (A) ADICIÓN DE FERROCIANIDA DE POTASIO Y SOLUCIÓN TAMPÓN A EXTRACTOS DE CACAO; (B) ADICIÓN DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO Y CLORURO FÉRRICO; (C) DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR FRAP EN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS.



A)



B)

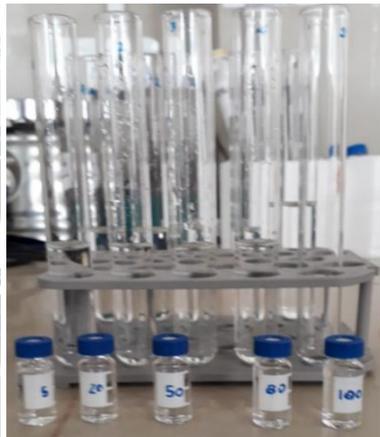


C)

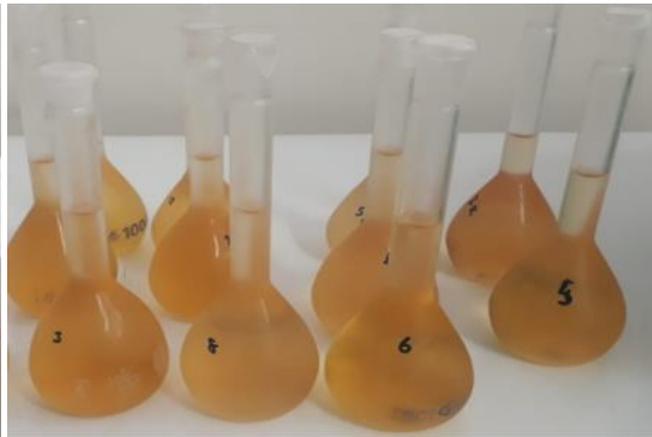
ANEXO CC:(A) Y (B) PREPARACIÓN DE FASE MÓVIL Y ESTÁNDARES; (C) ADECUAMIENTO DE MUESTRAS DE CACAO CON CARREZ 1 Y CARREZ 2; (D) CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES (TBR Y CAF) EN HPLC.



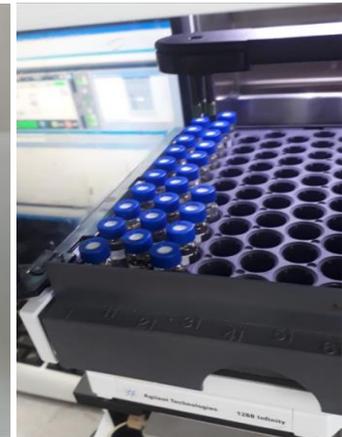
A)



B)



C)



D)

ANEXO DD: (A) ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS (UV-VIS-2600 SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU) ; (B) HPLC (AGILENT TECHNOLOGIES)



A)



B)

ANEXO EE: CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE NORMATIVA



epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

*UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL*

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 24 / 05 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Valeria Paulina Toaquiza Vallejo
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Química
Título a optar: Química
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.

0992-DBRA-UTP-2022