

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS, TECNOLOGÍA E INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS



**“COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE LA CÁSCARILLA DE GRANOS DE
CACAO (*Theobroma cacao L.*) TOSTADO Y
ELABORACIÓN DE UN FILTRANTE”**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TOLENTINO LAVADO, MARUJA

PROMOCIÓN 2014 – II

Tingo María – Perú

DEDICATORIA

A **Dios** todo poderoso por darme la vida y la salud; a mi padre **Solano Tolentino Cazo** por ser un ejemplo de superación y guía en cada momento de mi existencia.

A mi madre y amiga **Antolina Lavado Dimas** con todo mi amor, por apoyarme incondicionalmente y por sus consejos durante el proceso de mi carrera profesional.

A mis hermanos: **Sunilda, Yesenia, Leonel y Roy** por su cariño y que nuestra unidad nunca se rompa; a mis tios **Víctor Lavado** y **David Tolentino** por ser un ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTO

- Al Dr. Pedro Pablo Peláez Sánchez, Asesor, por su valiosa colaboración en la investigación y su apoyo incondicional en la culminación de la tesis.
- Al Ing. Darlym Reátegui Díaz, por su apoyo incondicional en enseñanzas durante el desarrollo de la investigación.
- Al Ing. Eduardo Cáceres Almenara y Alfredo Abelardo Carmona Ruiz por sus orientaciones, enseñanzas durante el desarrollo y redacción de la tesis.
- Al Ing. Alipio Ortega Rodríguez, por el apoyo incondicional durante el proceso de la investigación.
- A los Ing. Yolanda Ramírez Trujillo, por su ayuda durante el desarrollo de la investigación.
- A mis amigos, Yesmín Yavar, William Cárdenas, Fiorella Ruiz, y a todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron posible la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.Aspectos generales de cacao (<i>Theobroma cacao</i>).....	3
2.1.1. Origen y distribución geográfica del cacao	3
2.1.2. ClasificaciónTaxonómica	3
2.2. Cascarilla de cacao	4
2.2.1. Proceso de obtención de cascarilla de cacao	4
2.2.2. Compoción química de cascarilla de cacao	5
2.3. Aspectos generales de polifenoles	6
2.3.1. Descripción	6
2.3.2. Clasifici3n de los polifenoles.....	7
2.4. Aspectos generales de las antocianinas.....	9
2.4.1. Definici3n	9
2.4.2. Estructura de las antocianinas y color	10
2.4.3. Factores que alteran la estabilidad de las antocianinas	11
2.5. Generalidades del antioxidante	12
2.5.1.Definici3n del antioxidante	12
2.5.3.Tipos de antioxidantes.....	12
2.5.3.Radicales libres	13
2.5.4.Func3n de los antioxidantes	13
2.5.5. M3todos de an3lisis para la capacidad antioxidante.....	13
2.5. Aspectos qu3micos	14

2.6.1. Metilxantinas.....	14
2.7. Infusiones.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Lugar de ejecución	17
3.2. Muestras de cascarilla de cacao.....	17
3.3. Equipos, materiales y reactivos	18
3.3.1. Equipos de Laboratorio	18
3.3.2. Materiales de laboratorio.....	18
3.3.3. Reactivos y solventes	19
3.4. Métodos de análisis	21
3.4.1. Composición química proximal de la cascarilla de cacao tostado	21
3.4.2. Determinación de polifenoles totales, teobromina, antocianinas, cafeína y capacidad antioxidante de la cascarilla de cacao tostado	21
3.5. Metodología experimental	22
3.5.1. Muestras, acondicionamiento de la cascarilla tostada y extracto	22
3.5.2. Composición química proximal de la cascarilla de cacao tostado	23
3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en la cascarilla de cacao tostado.....	23
3.5.4. Determinación de la capacidad antioxidante de la cascarilla de cacao tostado de los tres departamentos.	25

3.5.5. Cuantificación de antocianinas en la cascarilla de cacao tostado de los tres departamentos	27
3.5.6. Elaboración de filtrante	28
3.5.7. Cuantificación de Teobromina y Cafeína en la cascarilla de cacao tostado.....	30
3.6. Diseño experimental para evaluar las características químicas, polifenoles, capacidad antioxidante, antocianinas, teobromina y cafeína de las muestras de cascarilla de cacao tostado.....	33
3.7. Diseño experimental para evaluar los filtrantes de cascarilla obtenidos	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1. Composición química proximal de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	37
4.2. Cuantificación de polifenoles totales en la cascailla de caco tostado	41
4.2.1. Determinación de la curva estándar.....	41
4.2.2. Cuantificación de polifenoles totales	43
4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.....	45
4.3.1. Capacidad de inhibir radicales libres 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	45
4.4. Cuantificación de antocianinas en la cascarilla de caco tostado	46
4.5. Cuantificación de teobromina y cafeína presentes en la cascarilla de cacao tostado y de filtrante obtenido	49

4.6. Contenido de teobromina y cafeína en la cascarilla de cacao tostado	
según su procedencia.....	53
4.6.1. Teobromina.....	53
4.6.2. Cafeína.....	56
4.7. Contenido de teobromina y cafeína en la infusión del filtrante obtenido.....	57
4.7.1. Teobromina.....	57
4.7.2. Cafeína.....	59
V. CONCLUSIONES.....	61
VI. RECOMENDACIONES.....	63
VII. ABSTRACT.....	64
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
IX. ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química de cascarilla de cacao	6
2. Paramentros cromatográficos propuestos para en análisis de teobromina, y cafeína por HPLC.....	31
3. Resultados del análisis químico de las cascarillas de cacao según su procedencia.	40
4. Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles	41
5. Cuantificación de polifenoles totales d ela cascarilla de cacao tostado según su procedencia	44
6. Resultados del IC ₅₀ del radical DPPH de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	46
7. Cuantifcación de antocianinas en la cascarilla de cacao según su procedencia	48
8. Estándares utilizados y características obnetinidas en el HPLC	50
9. Datos para obtener la curva estándar de Teobromina.....	50
10. Datos par obtener la curva estándar de cafeína	51
11. Contenido de teobromina (TB) en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.....	55
12. Contenido de cafeína (CF) en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	56
13. Contenido de teobromina (TB) en la infusión obtenido del filtrante.	58
14. Contenido de cafeína (CF) en la infusión obtenido del filtrante.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Partes de la semilla de cacao.....	4
2. Estructura química de las antocianinas	10
3. Formula química de la teobromina.	15
4. Formula química de la cafeína.....	16
5. Flujograma para realizar la obtención de cascarilla de cacao tostado.....	22
6. Flujograma para obtener polifenoles en la cascarilla de cacao	25
7. Flujograma para la evaluación de la capacidad antioxidante en la cascarilla de cacao tostado.....	26
8. Flujograma para realizar análisis de antocianinas en cascarilla de cacao.....	28
9. Flujograma para obtener filtrante a partir de la cascarilla de cacao.....	29
10. Diseño experimental para evaluar caracteisticas química proximal, polifenoles, DPPH, Antocianinas en muestras de cascarilla de cacao tostado.....	33
11. Diseño experimental para determinar teobromina y cafeína en la cascasrilla de cacao tostado.....	35
12. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales	42
13. Presentación del contenido de polifenoles totales en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	44

14. Comportamiento del IC ₅₀ del radical DPPH de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	46
15. Representación del contenido de antocianinas de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	49
16. Linealidad y curva de calibración de Teobromina	51
17. Linealidad y curva de calibración de Cafeína	52
18. Evolución del sistema cromatográfico para la evolución de teobromina y cafeína	53
19. Presentación del contenido de teobromina en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	55
20. Presentación del contenido de cafeína en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia	57
21. Presentación del contenido de teobromina en infusión obtenido del filtrante	58
22. Presentación del contenido de Cafeína en la infusión del filtrante obtenido	60
23. Perfil Cromatográfico de la cascarilla	83
24. Perfil Cromatográfico del filtrante	83

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Pag.
01. ANOVA del análisis de humedad	75
02. Prueba de Tukey de humedad por efecto de procedencia.....	75
03. ANOVA del análisis de proteína.....	75
04. Prueba de Tukey de proteína por efecto de procedencia	76
05. ANOVA del análisis de fibra	76
06. Prueba de Tukey de fibra por efecto de procedencia.....	76
07. ANOVA del análisis de grasa	77
08. Prueba de Tukey de grasa por efecto de procedencia.....	77
09. ANOVA del análisis de ceniza.....	77
10. Prueba de Tukey de ceniza por efecto de procedencia	78
11. ANOVA del análisis de carbohidratos	78
12. Prueba de Tukey de carbohidratos por efecto de procedencia	78
13. ANOVA del análisis de polifenoles.....	79
14. Prueba de Tukey de polifenoles por efecto de procedencia.....	79
15. ANOVA del análisis de DPPH	79
16. Prueba de Tukey de DPPH por efecto de procedencia.....	79
17. ANOVA del análisis de Antocianina	80
18. Prueba de Tukey de Antocianina por efecto de procedencia	80
19. ANOVA del análisis de teobromina de la cascarilla	80
20. Prueba de Tukey de teobromina de la cascarilla por efecto de procedencia	81
21. ANOVA del análisis de cafeína de la cascarilla.....	81

22. ANOVA del análisis de teobromina del filtrante.....	81
23. Prueba de Tukey de teobromina del filtrante por efecto de procedencia	82
24. ANOVA del análisis de cafeína del filtrante.....	82
25. Prueba de Tukey de cafeína del filtrante por efecto de procedencia	82
26. Perfil Cromatográfico de la cascarilla.....	83
27. Perfil cromatográfico del filtrante.....	83
28. Materia prima	84
29. Proceso de preparación de muestra, para su posterior análisis.....	84
30. Proceso de análisis químico proximal	84
31. Proceso de análisis de polifenoles, DPPH, antocianinas	85
32. Proceso de elaboración de filtrante.....	85
33. Proceso de análisis de teobromina y cafeína por el método de HPLC en cascarilla y filtrante.....	85

RESUMEN

Se investigaron cuatro muestras de cascarillas de cacao de la zona de Tingo María (CTM), San Alejandro (CSA), Santa Lucía (CSL) y Planta Industrial Naranjillo (CPI); se evaluó la composición química proximal, polifenoles totales (PT), capacidad antioxidante (CA), antocianinas (A), teobromina (Tb), cafeína (Cf) y en la infusión obtenida del filtrante elaborado, se determinó Tb y Cf. Se analizó estadísticamente con un diseño DCA y la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$); se utilizó el software STATGRAPHICS Centurión XV II. La muestra CPI presentó mayor contenido de humedad 10,05 %, en la CSL se encontró el mayor contenido de ceniza con 10,78 % y la CSA presentó el mayor contenido de carbohidratos con 51,75 %. El mayor contenido de PT lo presentó CSL $3,90 \pm 0,049$ g AGE/100g. La mejor CA frente al radical DPPH lo presentó CTM con $0,23 \pm 0,940$ IC₅₀ mg/mL. La CPI presentó el mayor contenido de A con $0,58 \pm 0,059$ mg cianidina-3-glucosido/g. La mayor cantidad de Tb lo presentó la CSL $0,132 \pm 0,009$ g TB/100g y la mayor cantidad de Cf se encontró en la CTM $0,015 \pm 0,012$ g CF/100g. El Filtrante de San Alejandro (FSA) presentó mayor contenido de TB $0,045 \pm 0,001$ g TB/100mL y el menor contenido el filtrante Planta Industrial (FPI) con $0,022 \pm 0,000$ g TB/100mL; el mayor contenido de CF lo presentó el FTM $0,564 \pm 0,065$ g CF/100mL y menor contenido el FPI $0,200 \pm 0,008$ g Cf/100mL.

I. INTRODUCCION

Perú cuenta con óptimas condiciones naturales para el cultivo de diferentes productos de gran demanda internacional, tales como cacao, un rubro a partir del cual se obtienen distintos productos agrícolas, siendo el de mayor importancia el chocolate. Por lo que se van dejando atrás potenciales materias primas, como la cascara, el mucilago y la cascarilla, desperdiciándose todas las propiedades que podrían ofrecer.

En la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo existe la producción de licor y manteca de cacao y chocolate. Sería una estrategia económica beneficiosa, tanto para el productor y la industria procesadora de cacao, dar un valor agregado y comercializar productos a partir de desechos generados en la manufactura de cacao, como es el caso de la cascarilla de cacao.

La cascarilla de cacao es una concha fibrosa que rodea al grano de cacao y es obtenida a partir del descascarillado de la semilla, es una materia seca, crujiente y de color marrón. Ha sido objeto de pocos estudios científicos en el Perú, ignorándose así los diversos beneficios que ésta posee y los potenciales usos que se le podrían dar.

Diversos estudios realizados en la cascarilla de cacao han demostrado propiedades nutritivas, en especial una importante capacidad

antioxidante. Una de las formas más eficiente de aprovechar estos antioxidantes es incorporarlo en la dieta de las personas a través de infusiones.

En tal sentido los objetivos del presente trabajo fueron:

Objetivo general

- Determinar los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de la cascarilla de granos de cacao tostado (*Theobroma cacao L.*) y elaboración de un filtrante.

Objetivos específicos

- Determinar la composición química proximal de la cascarilla de cacao tostado.
- Cuantificar polifenoles totales, capacidad antioxidante, antocianinas, teobromina, cafeína de la cascarilla de granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) tostado.
- Elaborar un filtrante a partir de la cascarilla de granos de cacao (*Theobromacacao L.*) tostado y cuantificar en la infusión, teobromina y cafeína.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales de cacao (*Theobroma cacao*)

2.1.1. Origen y distribución geográfica del cacao

El cacao es una especie originaria del bosque húmedo tropical en América del sur. Geográficamente en el mundo las mayores áreas cacaoteras están concentradas entre los 10° de latitud Norte y Sur del Ecuador, distribuida en el Oeste Africano, América Latina y sur este de Asia **(AREVALO,2004)**.

2.1.2. Clasificación taxonómica

El cacao obedece a la siguiente clasificación taxonómica **(LEÓN 1968)**.

División: Fanerógamas.

Clase: Angiospermas.

Subclase: Dicotiledónea.

Orden: Málvales.

Familia: Sterculiáceae.

Género: *Theobroma*.

Sección: *Eutheobroma*.

Especie: *Theobroma cacao* L.

2.2. Cascarilla de cacao

Luego del descascarillado de la semilla de cacao se obtiene la cascarilla, la cual representa un 12% en peso de la semilla. Esta cascarilla tiene característica de un material fibroso, seco, crujiente, de color marrón y con un olor similar al del chocolate. Cuando es removida la cascarilla puede contener de 2 a 3% del grano que no pudo separarse (EFSA, 2008).

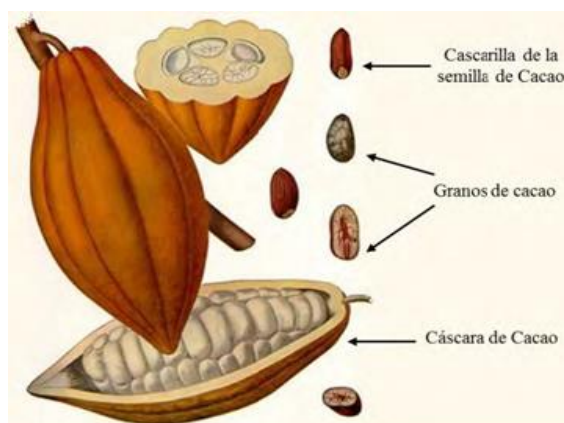


Figura 1. Partes de la semilla de cacao

2.2.1. Proceso de obtención de cascarilla de cacao.

Según RIGEL (2005) el proceso de obtención los nibs (granos sin cáscara) se realizan siguiendo las operaciones que se muestran a continuación.

- **Secado:** Después de la fermentación, las almendras tienen alrededor de 55% de humedad, debe reducirse al 6 - 8 %, que es la humedad en la cual se debe almacenar y comercializar. Durante ese tiempo, las almendras de cacao terminan los cambios para obtener el sabor y aroma a chocolate, también en ese momento cambian los colores, apareciendo

el color marrón (café), típico del cacao fermentado y secado correctamente, puede secar al sol, como también en secadoras artificiales.

- **Tostado:** Las almendras de cacao tienen que tostarse para facilitar la eliminación de la cascarilla. Sin embargo, cuando el tostado de las almendras se realiza a temperaturas altas o bajas y los periodos de tiempo son cortos o demasiado prolongados, el desarrollo de los perfiles de sabor son afectados favorablemente o por el contrario sufrir distorsiones. Los “cacaos finos” requieren una torrefacción menos fuerte que los “ordinarios”. Por lo general los granos de cacao son tostadas desde 110 hasta 150° C durante 25 a 50 minutos.
- **Descascarillado:** Como consecuencia del tostado, la cáscara que está adherida firmemente al grano en el cacao crudo, se separa de este, facilitando la operación de descascarado. El cacao y las cáscaras triturados, caen a una zaranda formada por tamices de diferentes calibres donde las cáscaras por su forma y menor peso específico son arrastradas por una corriente de aire, separándose de esta manera el nibs de la cáscara.

2.2.2. Composición química de cascarilla de cacao

En la actualidad, la cascarilla de cacao es adicionalmente utilizada como material orgánico para la preparación de abono, lo cual generalmente se da en las granjas donde es cultivado el cacao. Por otro lado, su composición lo hace ideal para la alimentación de rumiantes, pero es limitada debido a su

contenido de teobromina, un componente estimulante encontrado principalmente en las semillas de cacao y que pasa a la cascarilla (EFSA,2008).

Cuadro 1. Composición química de cascarilla de cacao

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

Fuente: EFSA (2008).

2.3. Aspectos generales de Polifenoles

2.3.1. Descripción

Los Polifenoles son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuamente distribuidos entre las especies vegetales, con más de 8000 estructuras químicas reportadas hasta el momento, que se caracteriza por tener en su estructura química al menos un anillo aromáticos unido a uno o más grupos hidroxilos y frecuentemente se encuentran como derivados de esteres, éteres y glucósidos (GIL, 2012).

Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, síntesis proteicas, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, defensa ante los factores adversos

del ambiente, además están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringente y dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal y la característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (**PALADINO,2008**).

2.3.2. Clasificación de los Polifenoles

Según **UGARTOND (2009)** pueden clasificarse en grupos como los ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos), flavonóides (antocianinas, flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas), estilbenos y lignanos.

Los polifenoles alimentarios se pueden clasificar en dos grupos: extraíbles y no extraíbles.

Los extraíbles: Son compuestos de pesos moleculares bajos o medios se pueden extraer empleando diferentes disolventes acuosos y acuoso-orgánicos (**LARREA, 2012**).

- Ácidos fenólicos, estructuras simples y que pueden aparecer libres, como el caféico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico, esterificados, como el clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico.
- Flavonoides, estructura mucho más complejas, que a su vez se subdividen en flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanoles o catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina), flavanonas (hesperidina, naringenina), antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), taninos condensados con un número bajo de monómeros ,etc.

Los flavonoides nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, se encuentra mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (también llamados agliconas flavonoides) (**QUIÑONES et al., 2012**). Representan un grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas, y en la actualidad, ya se han identificado más de 4000 compuestos diferentes, su estructura química común es un difenilpropano (C6-C3-C6), y consta de dos anillos aromáticos (A y B).

Unidos a través de tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (**GRANADO, 2010**).

Ácidos fenólicos: Son compuestos no flavonoides más estudiados, se caracterizan por tener un ácido carboxílico funcional, forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxinámico (**ADRIUZOLA, 2003**).

Los ácidos hidroxibenzoicos, como el ácido gálico y el ácido protocatecuico, se encuentran en muy pocos alimentos, forman parte de estructuras complejas como los taninos hidrolizables. Los ácidos hidroxicinámicos, son más comunes, representantes de este grupo son el ácido cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico (**GRANADO, 2010**).

Los polifenoles no extraíbles: Son compuestos con un elevado peso molecular, o polifenoles unidos a fibra dietética o proteína que se pueden encontrar en los residuos de las extracciones, incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados con un elevado número de unidades en la cadena polimérica (**LARREA, 2012**).

2.4. Aspectos generales de las antocianinas

2.4.1. Definición

Las antocianinas tienen significado del griego *anthos flor* y *kyanos* azul, son el grupo más importante de pigmentos solubles al agua visible para el ojo humano, forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos. Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos, se hallan en las células epidermales o subepidermales de la planta, principalmente en flores y frutos **(CUEVAS et al.,2008)**.

Actualmente se conoce aproximadamente 20, las más importantes son la pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de estas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos de anillo fenólicos se intensifica el color azul, mientras que la introducción metoxilos provoca la formación del color rojo **(BADUI, 2006)**

Las antocianinas y antocianidinas son metabolitos secundarios de color morado a rosa en las semillas de cacao, son productos a partir de las leucoantocianidinas o procianidinas (compuestos incoloros) por la acción de la enzima antocianidina sintasa en la ruta de biosíntesis de flavonoides **(MARQUEZ, 2009)**.

2.4.2. Estructura de las antocianinas y color

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C (Figura 2).

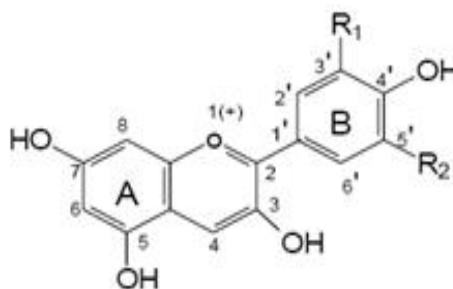


Figura 2. Estructura química de las antocianinas.

Su estructura química se conforma de un esqueleto que contiene quince carbono (C6-C6-C3), ordenados en dos anillos aromáticos (anillo A benzoil y anillo B hidroxicinamoil) unidos por un tercer anillo que consta de tres carbonos y un oxígeno (C₃O) (**MENDOZA, 2012**).

En la naturaleza, las antocianinas presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes como la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa, otra variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos, pueden ser alifáticos como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sináptico, gálico, p-hidroxibenzóico (**GARZON, 2008**).

2.4.3. Factores que alteran la estabilidad de las antocianinas

La estabilidad de las antocianinas depende de factores como enzimas, pH, temperatura, oxígeno, luz, metales, etc.

Efecto del pH: Las antocianinas son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino; en medio ácido la forma predominante es la ión flavilio, da el color rojo, cuando esta es sometida a pH básico o alcalino, el ión flavilio, es susceptible al ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose la pseudo base carbinol, esto es a pH 4,5 y seguido se forma la chalcona, las dos formas son incoloras **(CUEVAS et al., 2008)**.

Azúcares: Los azúcares a altas concentraciones estabilizan a las antocianinas, por la baja actividad del agua, uno de los factores de degradación, por el ataque nucleofílico al catión flavilio que ocurre en el C-2 formando la base carbinol incolora y cuando los azúcares están en bajas concentraciones no tendrán efecto sobre la actividad del agua, provocando que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleren la degradación de las antocianinas **(CONDEZO, 2011)**.

Temperatura: Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras **(GARZON, 2008)**, además la velocidad de degradación se incrementa durante el procesamiento y almacenamiento a mediada que la temperatura aumenta.

2.5. Generalidades del antioxidante

2.5.1. Definición de antioxidante

Los antioxidantes son de gran interés nutricional contribuyendo al mantenimiento de salud humana protegiendo al organismo del daño producido por agentes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental y sustancias químicas presentes en alimentos **(OVACO Y PINEDA, 2011)**.

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Se produce una oxidación, siempre que una especie cede electrones a otra, la especie que gana electrones se reduce, y la que pierde se oxida. En estas reacciones de oxidación, a veces, se puede producir radicales libres, especies muy oxidativas y que pueden producir daños al organismo **(RAMOS *et al.*, 2008)**.

2.5.2. Tipos de antioxidantes

Según **HICKS *et al.* (2006)** los tipos de antioxidantes son los siguientes:

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

Antioxidantes no enzimáticos: Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales

como selenio, zinc, o vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E), éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes.

2.5.3. Radicales libres

Se entiende por radical libre a cualquier átomo o molécula que contenga algún electrón no apareado en su orbital externo y que puede existir en forma independiente. Los electrones no apareados provocan inestabilidad y un aumento en la reactividad. Los radicales libres, en un intento por completar sus pares de electrones interaccionan con molécula adyacentes quitándoles electrones y como en una reacción en cadena, generan nuevos radicales libres **(PELÁEZ, 2009)**.

2.5.4. Función de los antioxidantes

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar interactúan más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, la acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de molécula, lípidos, proteínas, ADN, etc. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos **(MENDOZA, 2012)**.

2.5.5. Métodos de análisis para la capacidad antioxidante

Entre los métodos desarrollados para medir la actividad antirradical son la actividad antioxidante equivalente a trolox (TEAC), la capacidad de

absorción de radicales de oxígeno (ORAC), la absorción total de radicales potenciales (TRAP), la fotoquimioluminiscencia (PCL) y el método de decoloración del radical 2,2, difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (**JULIÁN, 2009**).

- **Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH):** El fundamento del método de coloración por Brand-Williams, consiste que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decoloración hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre, se calcula el IC₅₀ que es la concentración de muestra necesaria para reducir el 50% de la concentración de radical DPPH (**RAMOS, 2008**).

2.6. Aspectos químicos

2.6.1. Metilxantinas

Teobromina

La teobromina (C₇H₈N₄O₂, de nombre químico 3,7-dimetilxantina o 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona) es un alcaloide de la familia de las Metilxantinas, familia que incluye también a la teofilina y la cafeína. En estado puro, es un polvo blanco. Es soluble en ácidos y bases, poco soluble en agua y alcohol etílico, y prácticamente insoluble en éter etílico.

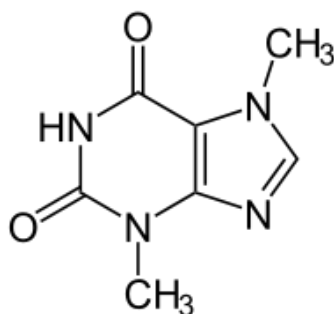


Figura 3. Formula química de la teobromina

Esta sustancia se encuentra en la planta del cacao (*theobroma cacao*), principalmente en las semillas, las cuales contienen entre un 1% a un 4% de esta. Al fermentar y secar las semillas, y luego procesar el extracto obtenido, se obtiene el chocolate. El chocolate negro contiene aproximadamente 1,5% de teobromina, esto es diez veces más que el chocolate con leche común.

Cafeína

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva y estimulante. La cafeína fue descubierta en 1819 por el químico alemán Friedrich Ferdinand Runge: fue el quien acuñó el término Koffein, un compuesto químico en el café, el cual pasaría posteriormente al español como cafeína (**CALLE, 2011**).

Este alcaloide actúa como estimulante del sistema nervioso central y se encuentra presente también en forma natural en el té y el cacao (**GOTTELAND M., SATURNINO V., 2007**).

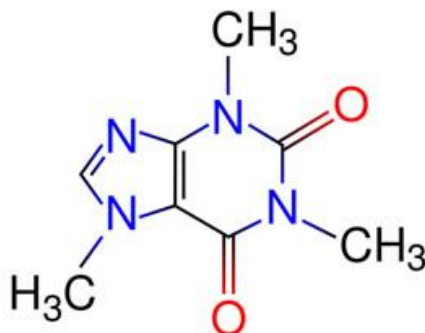


Figura 4. Formula química de la cafeína

La teobromina y la cafeína pertenecen a La familia de las purinas y representan más de 99% de los alcaloides presentes en el cacao. La concentración final de ambos, está determinada por el genotipo, el grado de maduración de las almendras y el nivel de fermentación **(WAKAO, 2002)**.

2.7. Infusiones

La norma COVENIN 1575-80 define las infusiones como aquellos productos que resultan de la extracción, por medio de agua caliente, de los principios flavonoides y aromáticos de ciertos vegetales, de los cuales se utilizan las hojas, ápices o tallos floridos jóvenes. Las infusiones son bebidas más populares del mundo, siendo una fuente de ingreso de numerosos países productores, como: China, India, Indonesia entre otros. Los factores que respaldan la popularidad de esta bebida son sus propiedades sensoriales, bajo precio y sus aportes al beneficio de la salud **(MACRAE et al., 1993)**.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se ejecutó en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en Tingo María, ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, a una altitud de 660 msnm con una temperatura promedio 25°C, con 82% de HR.

El presente trabajo se desarrolló en los meses de Enero a Mayo del 2015. Se trabajó en los laboratorios del Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), laboratorio de Análisis de Alimentos y laboratorio de Nutrición Animal.

3.2. Muestra de cascarilla de cacao

El material empleado para la investigación fue la cascarilla de cacao tostado (*Theobromacacao L.*) Para obtener la cascarilla; se acopiaron muestras de granos de cacao de cuatro zonas (Huánuco provincia de Leoncio Prado caserío de Rondos, San Martín Provincia Tocache Distrito de progreso, Ucayali provincia de Padre Abad Distrito de San Alejandro), estos granos fueron tostaron e inmediatamente se descascarillo, envasándose en bolsas de polietileno de alta densidad y una muestra de cascarilla (mezcla), dejándolo en almacenamiento a temperatura ambiente, hasta su posterior análisis

3.3. Equipos, materiales y reactivos

3.3.1. Equipos de laboratorio

- Espectrofotómetro modelo Genesys 10 (Thermo Electrón Corporation) SN 2M6G261002.
- Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión)
- Estufa modelo ODH6 -9240A (TOMOS Heating Drying Oven)
- Congelador FFV-2065FW -20°C (Frigidaire, USA)
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead)
- Agitador magnético modelo 625 standard
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2
- Centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich)
- pH - metro (Mettler Toledo Seven Easy) pH = 0-14
- Equipo Soxhlet, Gerhardt. Germany.
- Cocina eléctrica de plataforma Barnstead / Thermolyne. U. S. A.
- Digestor de proteína. Digest Automat K-438 BÜCHI laborotechnik. AG.
- Horno Mufla LABOR Műszeripari Művek temperatura regulable de 250 °C a 900 °C.

3.3.2. Materiales de laboratorio.

- Cubetas de poliestireno, (1cm x 1cm x 4.5cm).
- Matraces de Erlenmeyer de 150, 250 ml
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Vasos de precipitación (1000 mL., 500 mL., 100 mL., 50 mL.)

- Fiolas (1000 mL., 500 mL., 100 mL., 50 mL., 10 mL.)
- Gradillas
- Probetas graduadas de 10, 100 y 500 mL.
- Micropipetas regulables de 10 – 100 μ l y de 100 – 1000 μ l.
- Tubos de ensayo Gente Mate de 10 mL.
- Campana de desecación con perlas de silicagel.
- Bureta automática.

Otros materiales

- Tips, FISHERBRAND 200 y 1000 μ l.
- Microtubos (1,5-2,00 mL)
- Filtro de membrana de 0,2 μ m
- Microfiltro de jeringa de 0,2 μ m
- Pinzas
- Espátulas metálicas
- Campana de desecación con perlas de silicagel.
- Crisoles de porcelana, cap. 50 mL. Haldenwanger Berlín.
- Espátulas metálicas.
- Bolsitas filtrantes.
- Papel de filtro

3.3.3. Reactivos y solventes

- Acido sulfúrico (H_2SO_4) 50%.
- Ácido clorhídrico (HCl), 0,1N

- Hidróxido de sodio (NaOH) al 50%
- Éter bidestilado
- 1, 1diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH).
- Ácido clorhídrico (HCL)(Merk) pureza 36,5%
- Ácido gálico (C₇H₆O₅) al 98,1% Sigma Aldrich;
- Cloruro de potasio (KCL) (sigma) pureza 99,5%
- Acetato de sodio (CH₃COONa) (Merk) pureza 99%
- Folin – Ciocalteu, 2N, Sigma Aldrich.
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) p.a. ISO. Scharlau
- Theobromine ≥99% (MW: 180,16 g/mol sólido sigma- Aldrich,
- Caffeine (C₈ H₁₀ N₄ O₂) MW: 194,19 g/mol meets Sigma- Aldrich,
- Etanol Sigma Chemical.
- Metanol (grado HPLC), Sigma Chemical.
- Etanol al 99,99% Merck
- Agua destilada desionizada (H₂O dd).

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Composición química proximal de la cascarilla de cacao tostado

Las determinaciones analíticas fueron: humedad, ceniza, proteína, grasa, fibra y carbohidratos y se realizaron de acuerdo a los métodos siguientes:

- Humedad, método N° 942.05 **(AOAC, 1990)**.
- Ceniza, método N° 942.05 **(AOAC, 1990)**.
- Proteína semimicro kjeldahl, N° 984.13 **(AOAC,1990)**
- Grasa método Soxhlet, N° 948,16 **(AOAC, 1990)**.
- Fibra método N° 962,09 **(AOAC, 1990)**.
- Carbohidratos, por diferencia restando de 100 el porcentaje de proteína, grasa, humedad, fibra y ceniza **(HART Y FISHER, 1991)**.

3.4.2. Determinación de polifenoles totales, teobromina, antocianinas, cafeína y capacidad antioxidante de la cascarilla de cacao tostado.

La determinación de polifenoles totales se realizó por el método Folin Ciocalteu **(SYMONOWICZ et al., 2012; SULTANA et al., 2012)**.

La cuantificación de antocianinas, se realizará por el método del pH diferencial **(POO, 2005., SYMONOWICZ et al., 2012)**.

La determinación de capacidad antioxidante se realizó por Inhibición del radical 1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), descrito por **(BRAND-WILLIAMS et al., 1995)**.

Determinación de teobromina y cafeína se realizó por, NAZARUDDIN *et. Al.* (2001), F. LO COCO *et. al.*, (2007).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Muestras, acondicionamiento de la cascarilla tostada y extracto

La Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, proporcionó las muestras de granos secos de cacao procedentes de las zonas de Tingo María, Ucayali, San Martín y una muestra de cascarilla (mezcla), el procedimiento de muestreo fue al azar.

Para el proceso de obtención de la cascarilla de cacao, las operaciones a realizar se indican en el flujograma de la Figura N° 5.

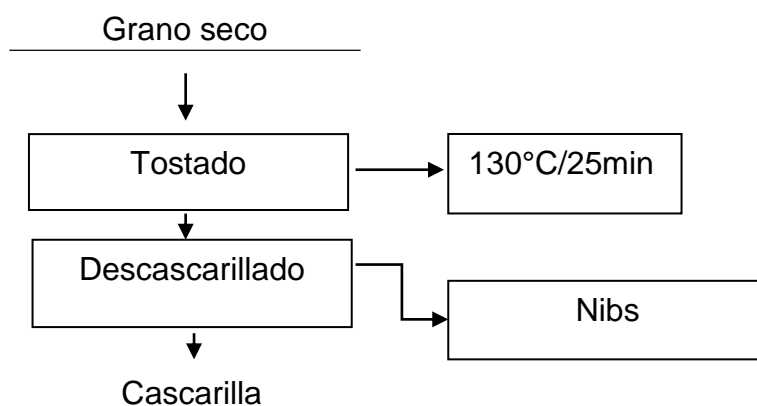


Figura 5. Flujograma para realizar la obtención de cascarilla de cacao tostado.

- **Grano seco:** los granos secos se obtuvo de región Huánuco, San Martín, Ucayali.

- **Tostado:** Consiste en un secado intenso de los granos de cacao a una temperatura de 125 ° C durante un tiempo de 25 minutos.
- **Descascarillado:** El descascarillado se realizó manualmente, facilitando la separación de la cascara del nibs
- **Cascarilla:** una vez obtenida la cascarilla se procedió a los estudios bioactivos y elaboración del filtrante.
- **Extracto:** se preparó un extracto hidroalcohólico de cascarilla de cacao a una concentración de 100mg/mL, se pesó 2 g de muestra, luego se enraso hasta 20 mL con solución hidroalcohólico (50/50 v/v), se transfirió a un frasco de vidrio de color ámbar, se tapó herméticamente y se dejó en el equipo de agitación rotacional, por 24 h, luego se filtró y se envaso en frascos de color ámbar y se almaceno a -18°C hasta su posterior análisis.

3.5.2. Composición química proximal de la cascarilla de cacao tostado

Los detalles para realizar el análisis químico proximal se muestran en los ítems 3.4.1.

3.5.3. Cuantificación polifenoles totales en la cascarilla de cacao tostado

- **Curva estándar**

La curva estándar se realizó preparando una solución stock de 100mL de ácido gálico a una concentración de 1mg/mL a partir de ello se hicieron las concentraciones siguientes: 10; 50; 100; 500; 1000 µg/mL, cada dilución se preparó por triplicado. Se agregó a cada tubo 1580 µL de agua

desionizada y 20 μL de muestra control y estándares, para el control se adiciono 20 μL de agua desionizada; se homogenizo ligeramente, luego se agregó 100 μL de solución de fenol Folin Ciocalteu, se incubo por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizo la reacción agregando 300 μL de Na_2CO_3 al 20% finalmente y finalmente se incubo por 2 horas a temperatura ambiente, para una completa reacción, luego se realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 700nm; con los resultados obtenidos se hizo la gráfica concentración vs absorbancia, se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

- **Cuantificación de polifenoles totales**

La cuantificación de polifenoles totales de las muestras de cascarilla de cacao tostado, se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100mg/mL (filtrando y centrifugando 10000rpm/10min a 4°C), a partir de ello se realizó la dilución de trabajo en 10 mg/mL, con tres repeticiones por tratamiento, luego se adiciono en lo tubos de ensayos para cada tratamiento 1580 μL de agua desionizada, 20 μL de extracto diluido (10 mg/mL) ,100 μL de fenol Folin Ciocalteu y finalmente 300 μL de Na_2CO_3 al 20% y se incubo por 2 h a temperatura ambiente y oscuridad, luego se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700nm.

Las absorbancia obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en equivalente de ácido gálico (g EAG/100g muestra).

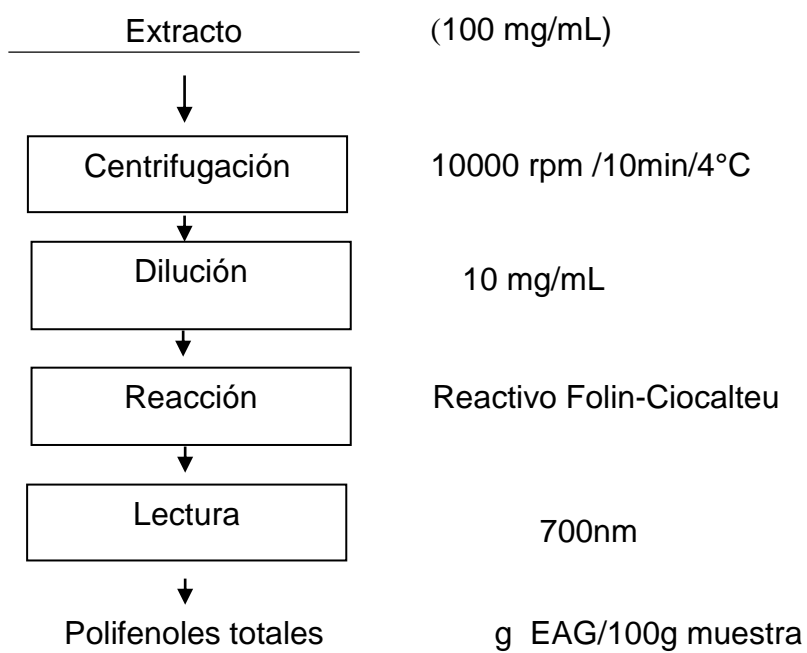


Figura 6. Flujograma para obtener polifenoles en la cascarilla de cacao tostado.

3.5.4. Determinar la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao tostado de los tres departamentos

- Capacidad de inhibir radicales libres 1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)

Para la determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical DPPH el procedimiento se presenta en la figura 5, para ello se preparó 10mL de solución stock de DPPH a 1Mm en etanol al 95% de pureza, se agito hasta la solubilización completa del compuesto y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de esta solución stock se reparó 100mL de DPPH a 100 μ M en etanol al 95% de pureza. El coeficiente de inhibición (IC_{50}) indica la cantidad de

extracto de la cascarilla de cacao mg/mL, requerido para inhibir el 50% del radical libre DPPH.

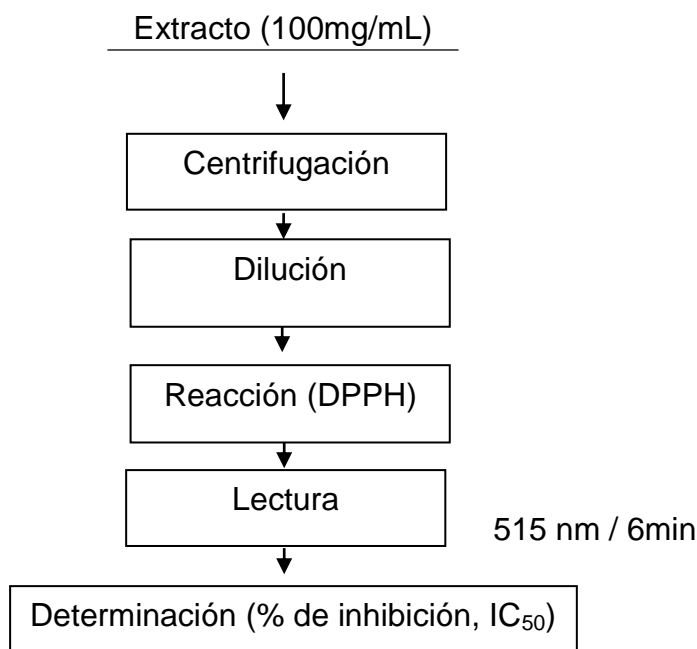


Figura 7. Flujograma para la evaluación de la capacidad antioxidante en la cascarilla de cacao tostado.

Se realizó la lectura en una cubeta de poliestireno se adicionó 25 μ L del volumen final de la solución de trabajo y 975 μ L de solución DPPH a 100 μ M, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 515 nm con intervalos de 30s por un tiempo de 6 min. Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{inhibición DPPH} = \left[\frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] * 100$$

Dónde: Abs control: Absorbancia del control y Abs Muestra: Absorbancia de la muestra en 6 min.

3.5.5. Cuantificación de antocianinas en la cascarilla de cacao tostado de los tres departamentos

- **Preparación de la solución Buffer**

Se preparó dos soluciones buffer

Buffer pH = 1: 125 mL de 0,2 M KCl y 375 mL de 0,2 M HCl y aforado a 1 L con agua desionizada.

Buffer pH = 4,5: 200 mL de 1 M CH₃COONa, 120 mL de 1 M HCl y 180 mL de H₂O desionizada y aforado a 1 L.

- **Procedimiento de análisis**

Para la cuantificación de antocianinas se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100mg/mL, filtrado y centrifugado 10000rpm/ 6min a 4°C, se trabajó con 3 repeticiones por tratamiento, tal como se muestra en la figura 8, en una cubeta de poliestireno se adicionó 200 µL de extracto de las muestras de los 4 muestras más 800 µL de buffer para ambos pH (1 y 4,5); y para el control se adicionó 1mL de agua destilada para cada pH (1 y 4,5) y se hizo la lectura en espectrofotometría UV/VIS a una longitud de onda de 520 y 700 nm.

La absorbancia obtenidas serán reemplazadas en la ecuación y expresada en mg cianidina -3-glucósido por g de muestra.

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})pH_{1,0} - A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})pH_{4,5}$$

$$PMA \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A * MW * DF * 1000}{\epsilon * 1}$$

Donde:

PMA : Pigmentos monoméricos de antocianinas

A : Absorbancia de la dilución de la muestra

MW : Peso molecular tabla 1.

DF : Factor de dilución

ε : Absortividad molar

El MW y el ε usado corresponden a la antocianina predominante en la muestra. Usar el ε de la literatura para cada pigmento de antocianina en solventes acuoso ácidos. Si el ε del componente antocinico mayoritario de la muestra no esta disponible en la literatura, o no es conocido, calcular el contenido de los pigmentos como mg de cianidina-3-glucócido, donde MW=44932 y ε =26900. La ecuación presentada asume un espesor de celda de 1 cm.

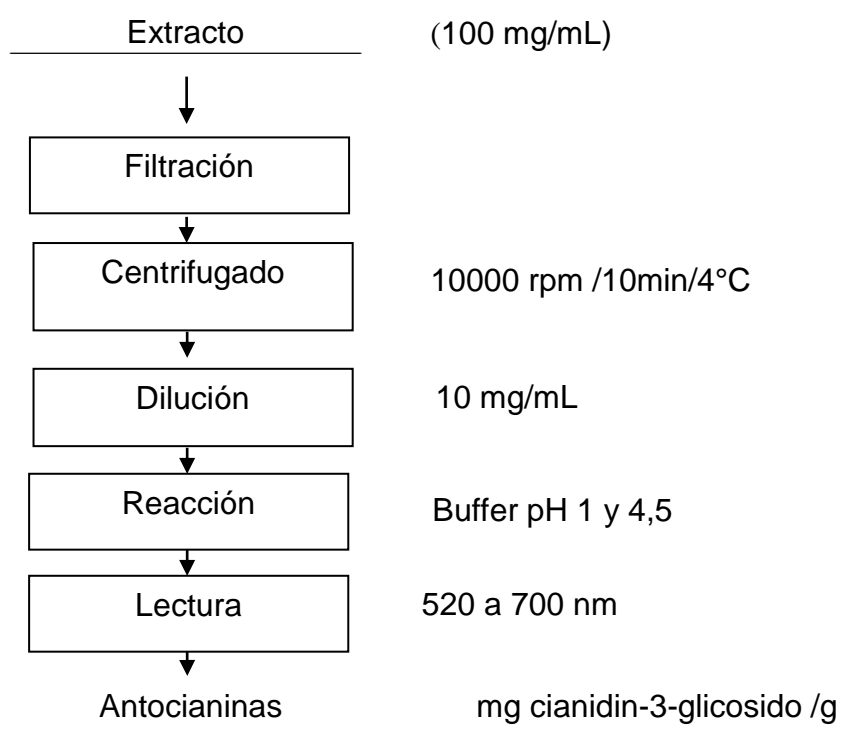


Figura 8. Flujograma para realizar análisis de antocianinas en cascarilla de cacao.

3.5.6. Elaboración del filtrante

Para la elaboración de filtrante obtenido a partir de la cascarilla de cacao tostado, para ello se emplearon las siguientes operaciones.

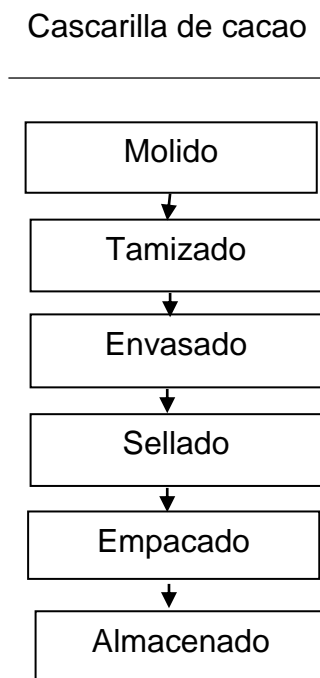


Figura 9. Flujograma para obtener filtrante a partir de la cascarilla de cacao.

Cascarilla de cacao: se almaceno en una bolsa de polietileno de alta densidad a una temperatura de ambiente.

Molino y tamizado: Para realizar el molido se utilizó con un molino (THOMAS SOIENTIHO CAUTION MOTOR HAS AUTOMATIC MODEL 4) acoplados con tamices mecánicos donde se colocan malla de diferentes para ello se colocó el tamiz de 1mm con la finalidad de que las partículas más grandes quedan en niveles superiores y las más finas en niveles inferiores que permiten obtener únicamente el producto con un tamaño de partícula deseada y requerido para preparar la infusión.

Envasado: Se envaso con papel filtro o tisú aliado con polímero y con poro de paso rápido para filtro con peso de 1,5g.

Sellado: Se selló con una selladora manual para envases filtrantes que permite el sellado completo.

Empacado: Se empaco con papel número 50 envases secundarios para contener el filtrante

Almacenado: Se almacenó en temperatura ambiente

3.5.7. Cuantificación de Teobromina y Cafeína en la cascarilla de cacao tostado

- **Análisis cromatográfico**

El análisis cromatógrafo se realizó usando un cromatógrafo líquido de fase reversa LC-10 AT VP Shimadzu Scientific, MD, USA., que consta de un desgasificador Shimadzu, DGU-14; un inyector manual Rheodyne 7725; un módulo de administración de solvente que incluye una bomba cuaternaria, Shimadzu LC-10 AT; un horno columna Shimadzu CTO-10 AS; un detector UV-Vis Shimadzu, SPD-10AV, usando para determinar la pureza del pico cromatográfico; interfase SCL 10AV. La identificación e integración de picos se realizó a través del software Shimadzu, Class-VP, versión 6.13 SP2.

La separación cromatográfica se realizó con un guarda columna, cartucho Ultra C18, 20nm x 4mm, Marca: Restek, Código: 917450220 y una columna cromatográfica Ultra C18, Dimensiones: 150mm x 4,6 mm x 5mm, Marca: Restek, Código: 9174565 La temperatura de la columna se mantuvo en 35°C.

La detección de teobromina y cafeína en cascarilla de cacao según su procedencia se realizó a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil seleccionada fue una mezcla de dos solvente como se indica en el cuadro 02, empleándose agua destilada, desionizada, la solución se microfiltra con un microfiltro de nylon de 0.2 μm .

Cuadro 2. Parámetros cromatográficos propuestos para el análisis de teobromina, y cafeína por HPLC.

Parámetro	Especificaciones
Fase móvil	24.9 % metanol grado HPLC 75.0 % agua grado HPLC 0.1 % Ácido acético
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL/min
Volumen de muestra	20 μL

- **Acondicionamiento de extracto para teobromina y cafeína**

Para la extracción de los compuestos se utilizó una solución de ácido acético al 0.3% y metanol grado HPLC (85:15), se empleó 0.02 g de cascarilla de cacao tostado molido en 5 mL de esta solución ácido acético / metanol (85:15), se agitó en un vortex por 15 min, se preparó una solución de 500 μg / mL y se microfiltró, quedando lista para ser inyectada al HPLC.

Para la extracción de los compuestos de filtrante obtenido se utilizó una solución de ácido acético al 0.3% y metanol grado HPLC (85:15), se realizó la infusión en agua hervida y se tomó el extracto 1000 μ L en 5 mL de esta solución ácido acético / metanol (85:15), se agitó en un vortex por 15 min, se preparó una solución de 500 μ g / mL y se microfiltró, quedando lista para ser inyectada.

- **Preparación del estándar de teobromina**

Antes de inyectar las muestras en el HPLC se calibró el instrumento con estándares de teobromina. Se preparó una solución stock de 1 mM, el estándar fue disuelto en agua de calidad HPLC, se prepararon soluciones de teobromina (3, 6, 12, 24; 36, 48 μ M)) que fueron usadas para levantar la curva estándar.

- **Preparación del estándar de cafeína**

Se preparó una solución stock de 3 mM de cafeína la cual se diluyó a diferentes concentraciones para levantar la curva estándar. El estándar fue disuelto en agua destilada desionizada y microfiltrada, se prepararon soluciones de cafeína (1.5; 3; 6; 12; 18; 24 y 30 μ M), que se usaron para levantar la curva.

3.6. Diseño experimental para evaluar las características químicas, polifenoles, capacidad antioxidante, antocianinas, teobromina y cafeína de las muestras de cascarilla de cacao tostado

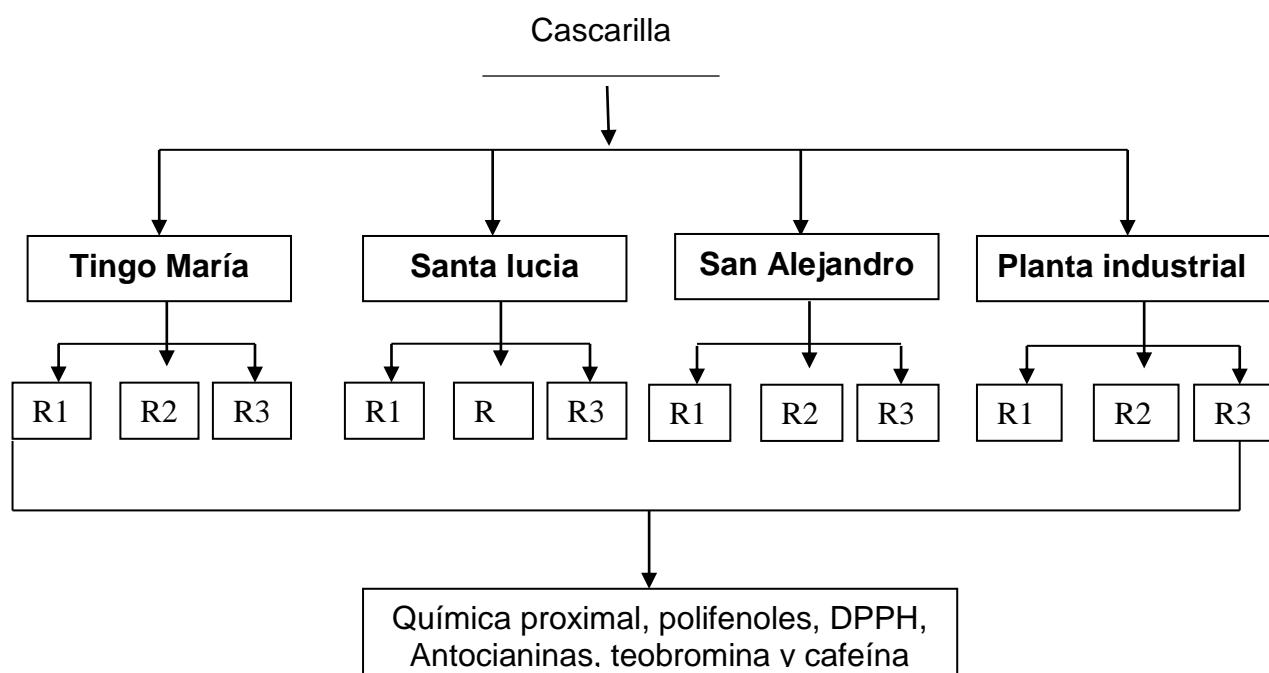


Figura 10. Diseño experimental para evaluar características química proximal, polifenoles, DPPH, Antocianinas teobromina y cafeína en muestras de cascarilla de cacao tostado

Los resultados de los diversos análisis a realizar, se realizó por triplicado, determinándose el coeficiente de variabilidad, la media y la desviación estándar, para cada caso. Para analizar los resultados de esta etapa se empleó un diseño completo al azar DCA simple, y la prueba de Tukey (DAZA P. J.F. 2006; LÓPEZ B. E.A. 2008).

Variable independiente: Zona geográfica de procedencia de las muestras de cascarillas de cacao.

Variable dependiente: Química proximal, Polifenoles totales, antocianinas, DPPH, teobromina y cafeína.

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Química proximal, Polifenoles totales, antocianinas, DPPH, teobromina y cafeína.

μ = Media general.

α_i = Zona geográfica de procedencia de las muestras de cascarillas de cacao.

E_{ij} = Error experimental.

Para evaluar la diferencia estadística se empleó la prueba de Tukey, con un nivel de significación de ($p < 0.05$) el análisis se realizó utilizando el software STATGRAPHICS Centurión XV, versión 15.2.06.

3.7. Diseño experimental para evaluar los filtrantes de cascarilla obtenidos

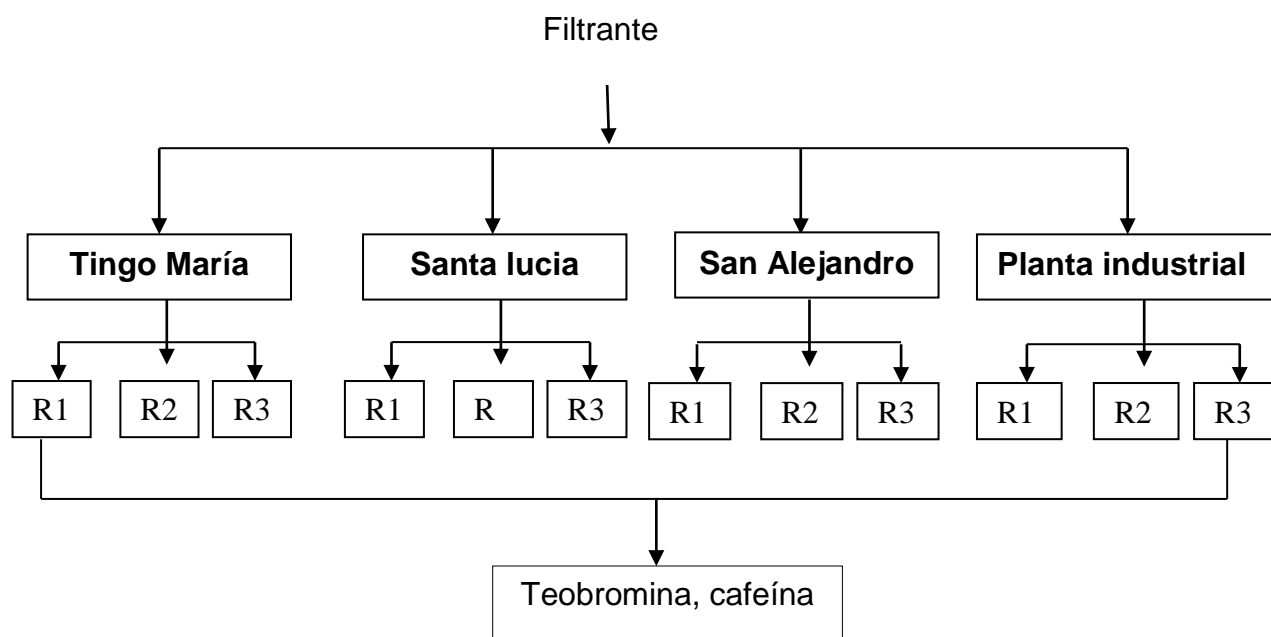


Figura 11. Diseño experimental para determinar teobromina y cafeína en la infusión del filtrante obtenido

Los análisis se realizaron por triplicado, determinándose el coeficiente de variabilidad, la media y la desviación estándar, para cada caso. Para analizar los resultados de esta etapa se empleó un diseño completo al azar DCA simple, y la prueba de Tukey para evaluar la significación estadística (DAZA P. J.F. 2006; LÓPEZ B. E.A. 2008).

Variable independiente: Zona geográfica de procedencia de la muestra de filtrantes obtenidos

Variable dependiente: Teobromina, cafeína.

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = teobromina, cafeína.

μ = Media general.

α_i = Zona geográfica de procedencia de filtrantes obtenidos de la cáscarilla de cacao tostado.

E_{ij} = Error experimental.

Para evaluar la diferencia estadística se empleó la prueba de Tukey, con un nivel de significación de ($p < 0.05$) el análisis se realizó utilizando el software STATGRAPHICS Centurión XV, versión 15.2.06.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición química proximal de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia

En el Cuadro 3, se muestran los resultados del análisis químico de las cascarillas de cacao según su procedencia

El valor de la humedad más alto fue de 10,05%, correspondiente a la muestras de cascarilla de la Planta industrial Naranjillo, determinándose valores de 4,05% en la cascarilla Tingo María, 4,11% en la cascarilla Santa Lucia, 5,66% en la cascarilla San Alejandro. Valores aproximados a los reportados en estudios previos de la Cascarilla de cacao venezolano con variación de valores entre 4,45% a 5,08 % (**ELBA et al., 2014**). En estudios realizados por (**MARTÍNEZ et al, 2012**) reporta que la humedad de cáscara de grano de cacao esta entre 7,71-7,80%.

Según el ANOVA (ANEXO I, Cuadro 15) existió diferencia estadística entre las muestras de las diferentes zonas ($p \leq 0,05$) y según la prueba de Tukey cuadro 16, todas las muestras son diferentes y la cascarilla de Tingo María presentó el contenido de humedad más bajo (4,05%).

Las cenizas totales de las muestras variaron entre 8,03% a 10,25%, valor superior a los reportados en estudios previos entre 7 y 8% (**ELBA et al., 2014**).

En estudios realizados por **(MARTÍNEZ et al, 2012)** reportaron el contenido de ceniza en la cáscara de grano de cacao según su localización variando entre 6,35-7,35% y el contenido determinado en la cáscaras de la vaina de cacao se aproxima con el rango 8,32-8,42%. Según el ANOVA (ANEXO I, Cuadro 23) existió diferencia estadística entre las muestras ($p \leq 0,05$) y según la prueba de Tukey cuadro 24, todas las muestras son diferentes y la cascarilla de Planta Industrial presentó el contenido de ceniza más bajo (8,03%).

En contenido de proteína, el valor se aproxima a 16,18-22,09%, en concordancia con el rango dado de 18,54-19,69%, por otros autores **(ELBA et al., 2014)**. En estudios realizados por **(MARTÍNEZ et al, 2012)** reportó que el contenido de proteína en la cáscara de grano de cacao, según su localización vario entre 15,79-15,89 %. Según el ANOVA (ANEXO-I, cuadro 17) existió diferencia estadística ($p \leq 0,05$) y según la prueba de Tukey cuadro 18, todas las muestras fueron diferentes y la cascarilla Planta Industrial presentó el contenido de proteína más alto 22,09%.

El contenido de grasa fue de 2,27-14,44 % superior a los estudios realizados por los autores que reportan entre 1,09-1,138% **(ELBA et al., 2014)**. En estudios relazados por **(MARTÍNEZ et al, 2012)** el contenido de grasa en la cáscara de grano de cacao según su localización se aproxima a 2,02-2,05%. Según el ANOVA (ANEXO-I, cuadro 21) existió diferencia estadística ($p \leq 0,05$) entre las muestras y según la prueba de Tukey cuadro 22 todas las muestras son diferentes y la cascarilla de San Alejandro presentó el contenido de grasa más bajo 2,27%.

Con respecto a la fibra cruda los resultados variaron entre 14,67-17,12%, superior a los resultados reportados por otros autores 5,23-6,27% **(LOPEZ, 2013)**; se sabe que la fibra dietética juega un papel importante en la prevención de varias enfermedades, coronarias, diabetes y problemas digestivos. El consumo de fibra ha adquirido importancia en los últimos años, obligando a la industria alimentaria desarrollar nuevos productos, más saludable y con un alto contenido de fibra dietética. Según el ANOVA (ANEXO-I, cuadro 19) existió diferencia estadística entre las muestras ($p \leq 0,05$) y según prueba de Tukey cuadro 20, todas las muestras son diferentes y la cascarilla de Tingo María presentó el contenido de fibra más alto 29,91%.

Al calcular el contenido de carbohidratos por diferencia se observaron valores entre 29,91 -51,75%, valor inferior a los reportados en estudios de la cascarilla de cacao Venezolano con valores entre 70,85%-72,82% **(ELBA et al., 2014)**. Los resultados indican que la procedencia de la muestra afectó significativamente la composición de las muestras analizadas. En estudios realizados por **(MARTÍNEZ et al, 2012)** reportaron contenidos de carbohidratos en la cáscara de grano de cacao según su localización, los reportados variaron entre 17,8-23,17% y en la cáscaras de la vaina de cacao se reportaron valores entre 28,73-20,04% lo cual se aproxima al estudio realizado. Según el ANOVA (ANEXO-I, cuadro 25) existió diferencia estadística ($p \leq 0,05$) entre las muestras y según la prueba de Tukey cuadro 26 todas las muestras fueron diferentes y la cascarilla de Planta Industrial presentó el contenido de carbohidratos más bajo 29,91%.

Cuadro 3. Resultados del análisis químico de las cascarillas de cacao según su procedencia.

Procedencia	Humedad (%)	Ceniza (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Carbohidrato (%)
Tingo María	4,05 ± 0,000	10,25 ± 0,006	21,85 ± 0,000	6,28 ± 0,000	17,12 ± 0,006	40,45 ± 0,010
Santa Lucía	4,11 ± 0,000	10,78 ± 0,000	21,86 ± 0,006	10,38 ± 0,006	15,29 ± 0,000	37,58 ± 0,000
San Alejandro	5,66 ± 0,000	9,48 ± 0,006	16,18 ± 0,012	2,27 ± 0,006	14,67 ± 0,006	51,75 ± 0,006
Planta Industrial	10,05 ± 0,006	8,03 ± 0,000	22,09 ± 0,006	14,44 ± 0,000	15,49 ± 0,000	29,91 ± 0,010

Los valores representativos (promedio ±SEM, n=3) indican diferencia estadística ($p \leq 0,05$). % humedad, %ceniza, %proteína, %grasa, % carbohidratos.

4.2. Cuantificación polifenoles totales en la cascarilla de cacao tostado

4.2.1. Determinación de la curva estándar

Para la cuantificación de polifenoles totales en la cascarilla de cacao tostado fue necesario establecer una curva de patrón y se elaboró en base al ácido gálico; las diluciones estuvieron comprendidas entre 0 a 1000µg/mL, los resultados se presentan en el siguiente cuadro 4 y figura 12

Para la curva estándar se utilizó compuestos puros y recomendados por los protocolos de análisis, **SOGI et al ., (2012)** utilizó ácido gálico para la curva estándar cuya concentración fue 10 a 100 µg/mL y fue leído a 725nm. Así mismo **ANDREW et al., (1989)** indican que el método de Folin-Ciocalteu permite medir fenoles totales y para la cuantificación debe crearse la curva de calibración y puede realizarse con ácido gálico (EGA), porque este es un compuesto estable y se pierde solo 5% de su valor real después de dos semanas de refrigerado y tapado.

Cuadro 4. Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles

Concentración (µg/mL)	Absorbancia (700nm)
0	0
10	0.008
50	0.041
100	0.086
500	0.489
1000	1.008

Los valores representativos (promedio) datos provienen del experimento

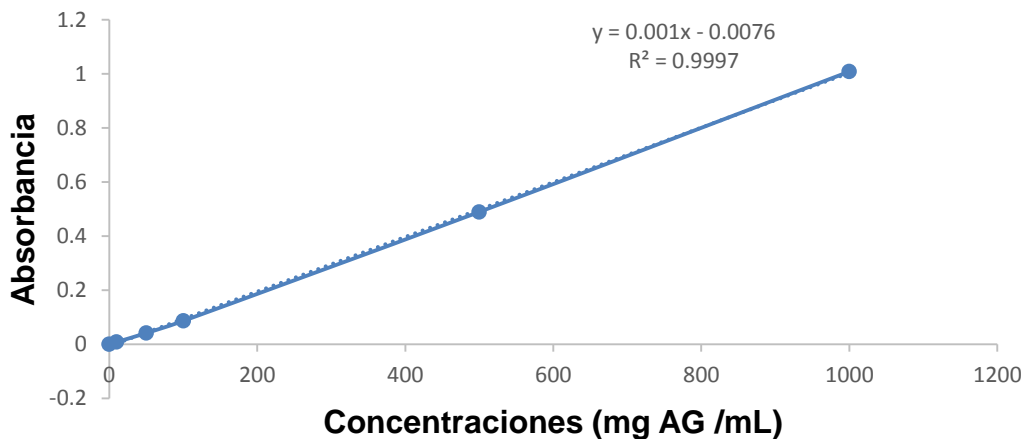


Figura 12. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

Según los resultados de la gráfica la ecuación encontrada es de primer orden teniendo como variables “y” (absorbancia) y “x” (concentración).

El valor de $R^2 = 0,9997$ indica que existe una relación positiva muy fuerte o casi perfecta al respecto (**RITCHEY, 2002**). Así mismo, valores cercanos a 1 se consideran ajustes casi perfectos, tiene una buena estimación de ajuste de los datos e implica que en el diagrama de dispersión correspondiente a las variables X y Y los puntos se disponen a lo largo de una línea recta.

4.2.2. Cuantificación de polifenoles totales

Los polifenoles predominantes de la cascarilla de cacao de diferentes países de mundo son especialmente catequinas, epicatequinas, en el cuadro 5 y figura 13 los resultados de la cuantificación de polifenoles totales en los gramos de cascarilla de cacao tostado. Realizado el análisis estadístico de la muestra se encontró que existe diferencia significativa entre las zonas según su procedencia (ANEXO I, cuadro 27) y según la prueba de Tukey (cuadro 28), toda las muestras son diferentes la cascarilla de Tingo María presento el contenido de polifenoles más bajo (2,67 g AGE/100g). En estudios realizados por otros autores en Cascarilla de cacao Venezolano Como materia prima de infusiones el contenido de polifenoles reportaron valores entre 2.40-2, 51 g AGE/100g muestra (**ELBA et al., 2014**), se aproximan al estudio reportado a cascarilla de Tingo María. También en estudios realizado por (**CARPIO Y JOHANA., 2014**) en subproductos de cacao como fuente de compuestos antioxidantes reportan entre 1,47-5,74 mg GAE/100g MS, lo cual está dentro de los rangos al estudio realizado de la tesis. En estudios realizados por (**CABRERA Y ANA., 2009**) titulado Cosmética Gourmet: Diseño de Exfoliantes Corporal con Propiedades Antioxidantes a Base de cascara de Semilla de *Theobroma cacao* Nacional se evidenció la presencia de polifenoles en la cáscara de cacao (2,00g EAG/100g) lo cual es inferior a los estudios reportados del tesis investigado.

Cuadro 5. Cuantificación de polifenoles totales de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.

Procedencia	Polifenoles Totales (g AGE/100g)
Tingo María	2,67± 0,227
Santa Lucia	3,90± 0,049
San Alejandro	3,22± 0,188
Planta Industrial	3,73± 0,477

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p \leq 0,05$).

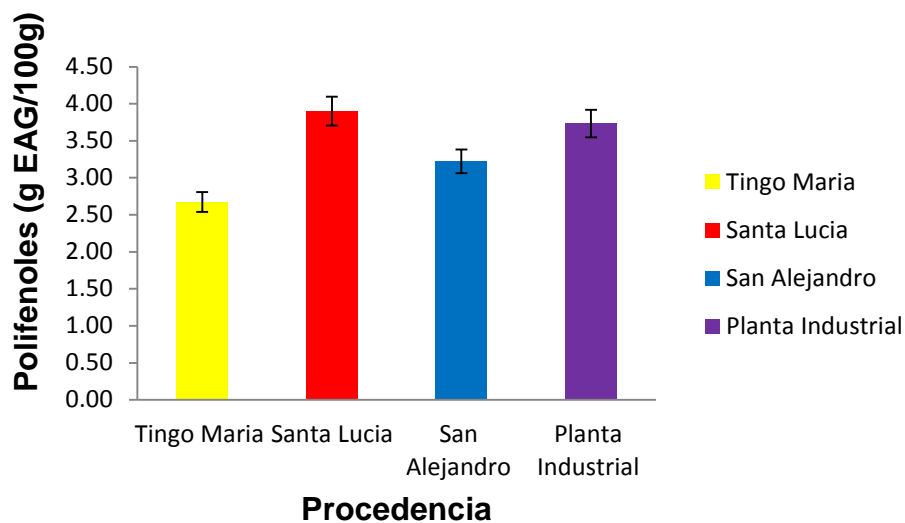


Figura 13. Presentación del contenido de polifenoles totales en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.

4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.

4.3.1. Capacidad de inhibir radicales libres 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

Como sabemos los antioxidantes son micronutrientes que están presentes en muchos alimentos e inhiben la iniciación o propagación de reacciones de oxidación en cadena de radicales libres; en el cuadro 6 y Figura 14, se representan los resultados de los valores IC_{50} del radical DPPH en cascarilla de cacao tostado según su procedencia. Realizando el análisis estadístico se encontró diferencia estadística entre las muestras ($p \leq 0,05$) (ANEXO I, cuadro 29), y según la prueba de Tukey (cuadro 30), la cascarilla procedente de Planta Industrial mostró mayor eficiencia para inhibir el radical DPPH con un resultado de $0,36 \pm 0,523 IC_{50}$ (mg/mL). El estudio realizado por **(MARTINEZ et al., 2012)** mostró mayor actividad antioxidante que la cascara de cacao de la localidad de Taura ($1,71 \pm 0,04 \mu M TE/g$) y la cascara de cacao de la localidad de Cone ($1,57 \pm 0,18 \mu M TE/g$). Según **(CARPIO, 2014)**, la concentración de actividad antioxidante en cascara de cacao por el método DPPH se encuentra en un rango de 0,37 a 0,71 μmol de Trolox/g MS.

Cuadro 6. Resultados del IC₅₀ del radical DPPH de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia

Procedencia	(IC ₅₀ (mg/mL))
Tingo María	0,23± 0,940
Santa Lucia	0,27± 0,686
San Alejandro	0,26± 0,581
Planta Industrial	0,36± 0,523

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística (p<0,05).

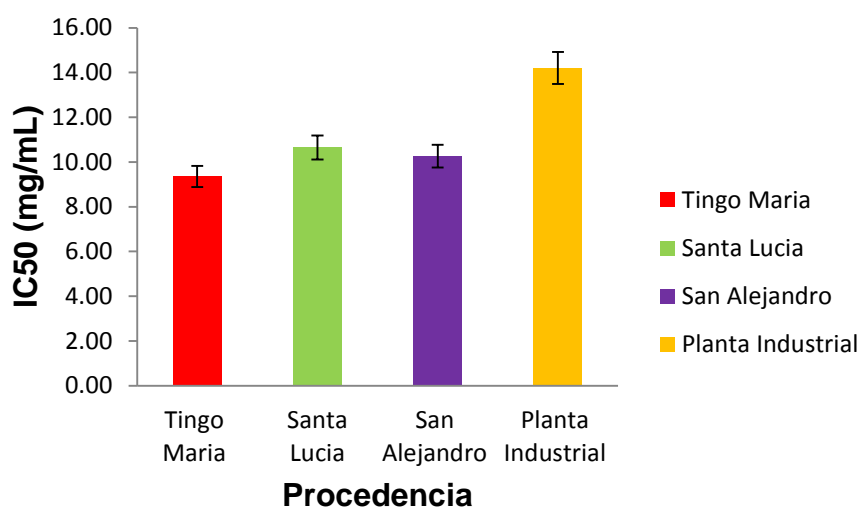


Figura 14. Comportamiento del IC₅₀ del radical DPPH de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia

4.4. Cuantificación de antocianinas en la cascarilla de cacao tostado

Las antocianinas pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, particularmente de los flavonoides, que se caracterizan por su solubilidad en

agua y por sus colores brillantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En el cuadro 7 y figura 15 se presentan los resultados de la cuantificación de antocianinas en la cascarilla de cacao tostado. Realizando el análisis estadístico de las muestras se encontró que existe diferencia estadística entre los contenidos de antocianinas de las muestras ($p \leq 0,05$) (Anexo I, cuadro 32), comparando con los promedios mediante la prueba de Tukey cuadro 33, la cascarilla de Planta Industrial presentó el contenido de antocianinas más alto ($0.58 \pm 0,059$ mg cianidina-3-glucosido/g). En estudios realizados por **(SANDRA et al., 2013)** se observa que los valores varían en un intervalo de 0,59 – 1,60 mg/g en grano sin fermentar, así como 0,27- 1,05 mg/g en granos fermentados. Los valores reportados son similares a nuestros resultados.

En estudios realizados por **(RONAL, 2013)** el contenido de antocianinas encontrado en los diferentes lotes de muestreo durante el procesamiento del licor y polvo de cacao fue entre 0,332-0,419 mg cianidina-3-glucósido/g de muestra, valores similares. Esta dentro del promedio estudiado de antocianinas en la cascarilla de cacao según su procedencia entre 0,23-0,58 mg cianidina-3-glucosido/g.

Comparando el cacao en función a los grupos genéticos podemos indicar que los forasteros contienen mayor antocianina que los trinitarios al respecto **(CUBERO, 1990)**, el grupo Criollo presentó más antocianinas que el grupo forastero, luego el grupo trinitario, después de que se fermentan fue el grupo Forastero el que más antocianinas retuvo. **(MARQUEZ, 2009)**, determinó en granos de cacao maduros sin fermentar, que los cacaos forasteros poseen más de 4 mg de antocianinas por grano de tejidos, mientras que los cacaos

criollos e híbridos (trinitarios), la concentración de antocianinas esta entre 0,1 y 2,3 mg/ g.

Según (ORFA, 2014), de los 7 clones de cacao y un criollo el contenido de antocianinas se encuentra entre $0,425 \pm 0,003$ a $0,122 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucosido/g. similar al estudio realizado en la cascarilla de cacao tostado.

Durante la fermentación las antocianinas sufren un hidrolisis enzimática por acción de las levaduras, además, parte de los alcaloides y polifenoles se pierden por oxidación (BARRAGAN Y REY, 2004). La concentración de antocianinas se reduce en un 90 % durante la fermentación tanto para cacaos nacional finos como para otros cacaos, las concentraciones más bajas se observaron a partir de los días 2 y 3 respectivamente. Esto podría afectar el contenido de antocianinas en la cascarilla de cacao tostado del estudio realizado.

Cuadro 7. Cuantificación de antocianinas en la cascarilla de cacao según su procedencia

Procedencia	(mg cianidina-3-glucosido/g)
Tingo María	$0.25 \pm 0,047$
Santa Lucia	$0.23 \pm 0,029$
San Alejandro	$0.36 \pm 0,079$
Planta Industrial	$0.58 \pm 0,059$

Los valores representan (promedio \pm SEM, n=3) valores de una misma columna con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

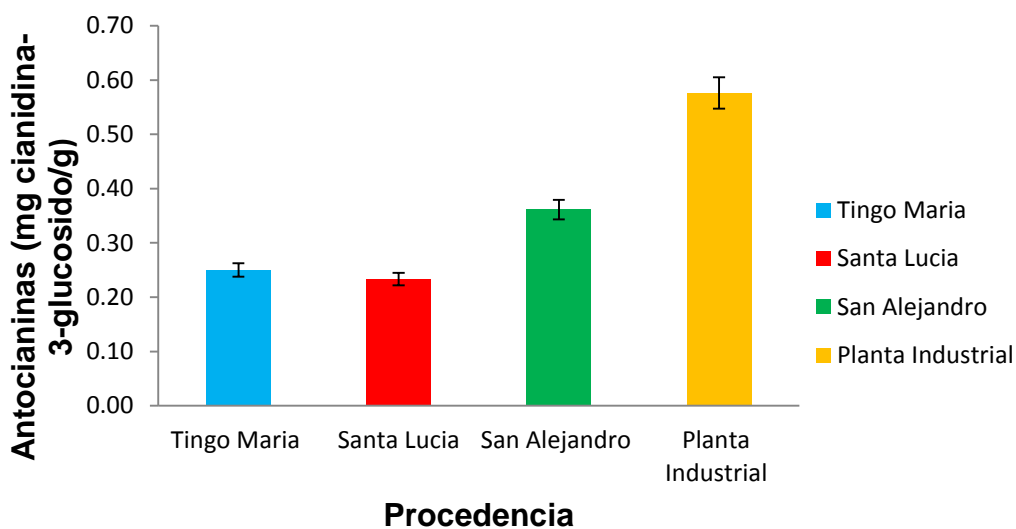


Figura 15. Representación del contenido de antocianinas de la cascarilla de cacao tostado según su procedencia

4.5. Cuantificación de teobromina y cafeína presentes en la cascarilla de cacao tostado y del filtrante obtenido

La determinación de teobromina y cafeína se realizó por HPLC, para ello se utilizó la longitud de onda de 270 nm, coincidiendo con lo reportado por (DING *et al.*, 1999). Para la cuantificación de teobromina y cafeína fue necesario establecer las características de los estándares y de la fase estacionaria, con el fin de obtener cromatogramas adecuados y conocer el orden de elusión de cada uno.

En el Cuadro 8 se presentan los estándares utilizados, concentración, área, y tiempo de retención (TR), se observó que la teobromina (Tb) eluyó primero, luego la cafeína (CF). El orden de elución de los estándares es igual al que reporta la literatura para el caso del té (DING *et al.*, 1999), pero los tiempos de retención variaron.

Cuadro 8. Estándares utilizados y características obtenidas en el HPLC

	Concentración	Área	Absorbancia	TR
Estándares	(μM)	(Mua*s)	(mUA*10 ⁻³)	(min)
Teobromina	12,0	160392	22975	2,99
Cafeína	118,0	302411	7904	6,44

Cuadro 9. Datos para obtener la curva estándar de Teobromina.

Concentración	Área ¹	Tiempo de retención
(μM)	270 nm	(min)
3	41123 \pm 567,461	3,162
6	75037 \pm 1574,653	3,158
12	158139 \pm 2720,902	3,158
24	309406 \pm 1843,131	3,163
36	462748 \pm 2794,022	3,158
48	05605 \pm 10947,557	3,162

¹Indica los valores representativos del área promedio \pm SEM debajo de la curva (picos HPLC), las absorbancias \pm SEM de 3 repeticiones por cada concentración de teobromina (Tb), realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

Los resultados para la curva estándar, se han reportado conforme se expresan en trabajos similares (**AGUILERA et al., 2010**) y según los resultados de la figura 16, las ecuaciones encontradas son de primero orden teniendo como variables “y” (área) y “x” (concentración), al respecto se indica que la forma de estudio de la asociación entre las variables “x” e “Y” es la regresión. Los valores R² variaron entre 0,9997 - 0,9998, indicando que existe un relación positiva muy fuerte o casi perfecta, esto concuerda con lo mencionado en otras investigaciones.

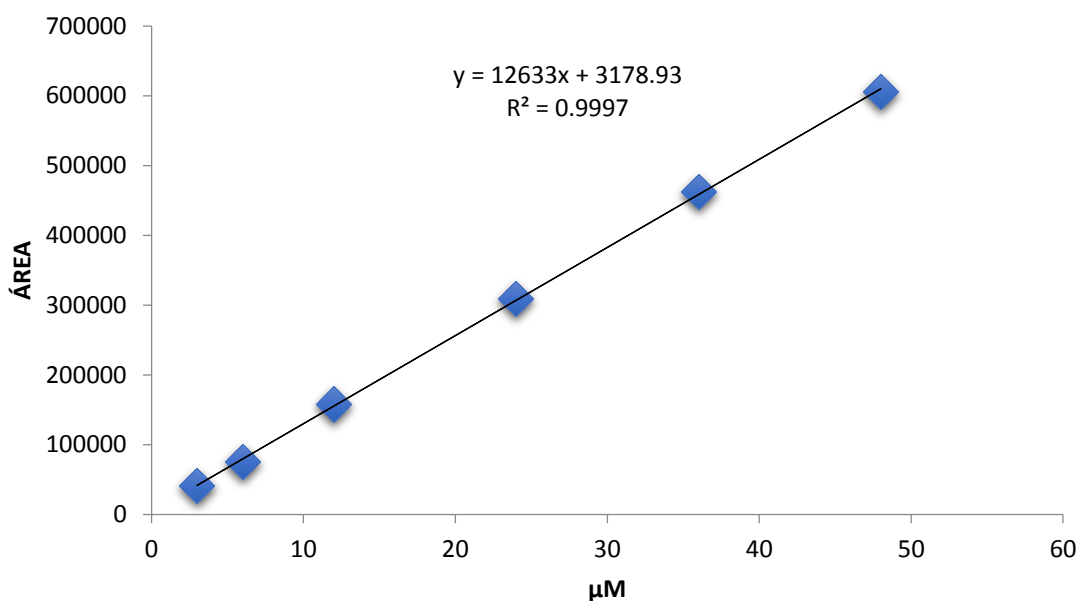


Figura 16. Linealidad y curva de calibración de Teobromina

Cuadro 10. Datos para obtener la curva estándar de cafeína.

Concentración (μM)	Área ¹ 270 nm	Tiempo de retención (min)
1,5	63358 \pm 1160,79	7,085
3	116609 \pm 2404,10	7,077
6	218654 \pm 3930,69	7,088
12	446747 \pm 2562,33	7,058
18	670711 \pm 3039,79	7,097
24	890118 \pm 16617,44	7,095

¹Indica los valores representativos del área promedio \pm SEM debajo de la curva (picos HPLC), las absorbancias \pm SEM de 3 repeticiones por cada concentración de cafeína (Cf), realizada en el sistema HPLC en fase reversa.

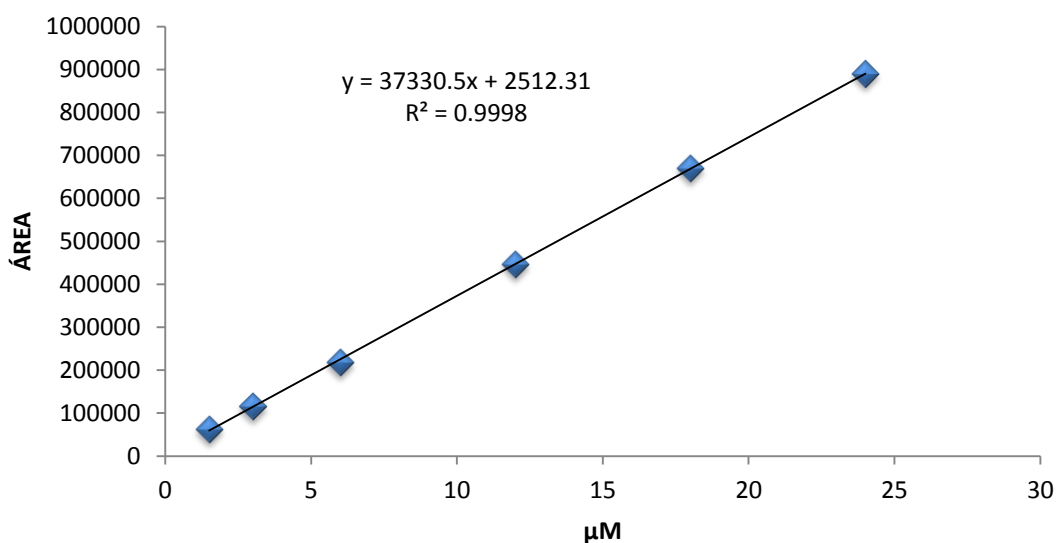


Figura 17. Linealidad y curva de calibración de Cafeína.

En la figura 16 y figura 17, se muestran las curvas estándares obtenidas, para TB y CF; en esta figura se aprecia que se han realizado seis corridas de soluciones conteniendo los dos estándares a la vez y a diferentes concentraciones. Se aprecia que los tiempos de retención para cada estándar coinciden cuando varían las concentraciones.

Para la estandarización de la metodología analítica y determinación del perfil de compuestos presentes en muestras de cacao, se han reportado diversos ensayos en procura de obtener las mejores condiciones cromatográficas. Inicialmente, se inyectaron muestras preparadas a partir de la extracción de granos de cacao desengrasado, solución de extracción acetona/agua/ácido acético (70/28/2) (LANGER et al., 2011); cacao sin desengrasar, extracción acuosa; cacao sin desengrasar, extracción ácido acético 0,3%/ metanol (85:15 v/v) (RISNER, 2008).

En la figura 18, se observa la evolución del sistema cromatográfico, en el cromatograma se observa la elución de 2 picos, uno de teobromina y el de cafeína.

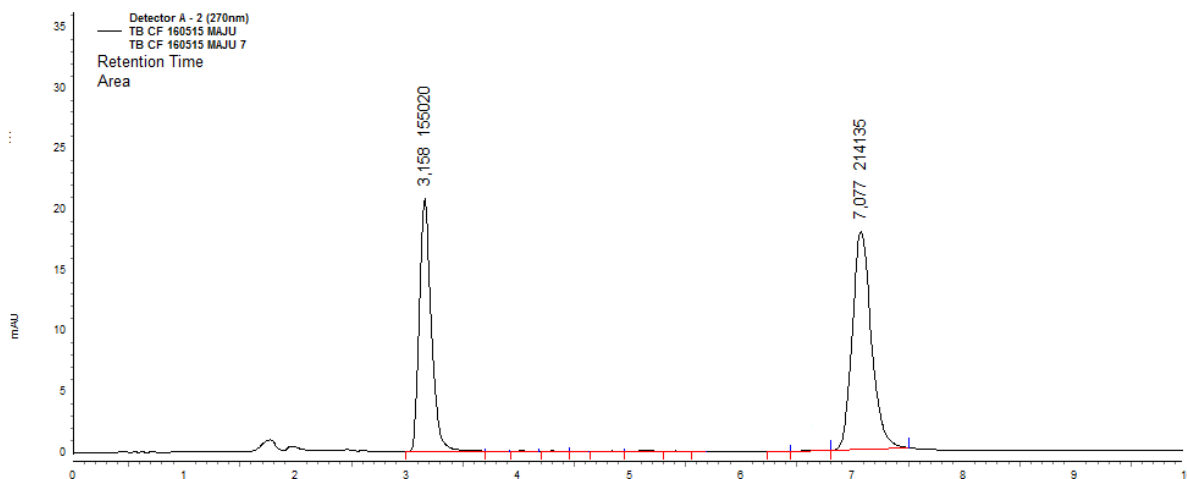


Figura 18. Evolución del sistema cromatográfico para teobromina y cafeína.

Por lo tanto los resultados de la Figura 18, permitieron establecer que las condiciones adecuadas para la extracción de los componentes de la muestras fueron: cascarilla, extracción ácido acético 0,3%/metanol (85:15 v/v), coincidiendo con investigadores (**RISNER, 2008**).

4.6. Contenido de teobromina y cafeína en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia

4.6.1. Teobromina

En el cuadro 11 se presentan los resultados del contenido de teobromina (TB), considerando los factores según su procedencia.

El carácter estimulante del chocolate se debe a la presencia de los alcaloides teobromina y cafeína, los cuales le confieren al cacao y todos los productos derivados de él un gran valor comercial **(ALBORNOZ, 1980)**.

Los resultados demuestran que las muestras de cascarilla de cacao tostado presentaron entre 0,076-0,132 g TB/100g, se observa en la figura 19 la cascarilla de Santa Lucia tiene mayor contenido de teobromina $0,132 \pm 0,009$ g TB/100g. Tal como se aprecia en el trabajo realizado por **(OSCAR, 1999)** quien determinó 0,190 g TB/100g, resultado que se encuentra dentro del rango de los resultados obtenidos. Según el análisis estadístico para los resultados de las muestras de cascarilla el contenido de TB (Anexo I, cuadro 33), presentó diferencia estadística, influyendo en el contenido de TB el factor zona.

La prueba de Tukey (Anexo I, cuadro 34) aplicada al efecto de las zonas, establece que se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. En los estudios realizados por **(LUCY, 2013)** el contenido de teobromina en los granos de cacao secos en las localidades de Pucacaca y Huingoyacu, a diferentes porcentajes de CCN51 presentaron valores entre $0,968 \pm 0,05$ - $1,069 \pm 0,04$ (gTB/ 100g), superiores a la cascarilla tostada. En estudios realizados en almendras de cacao nacional fino de aroma en zonas del litoral ecuatoriano, se determinó 0.20 % de teobromina **(CARLOS, 2014)**, valor superior al encontrado.

Cuadro 11. Contenido de teobromina (TB) en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.

Procedencia	Contenido de Teobromina (g TB/100g muestra)
Tingo María	0,115± 0,029
Santa Lucía	0,132± 0,009
San Alejandro	0,076± 0,001
Planta Industrial	0,123± 0,001

La cantidad de teobromina esta expresado en (g TB/100g muestra) de cascarilla de cacao tostado. Los valores representan el promedio \pm , n=3 repeticiones

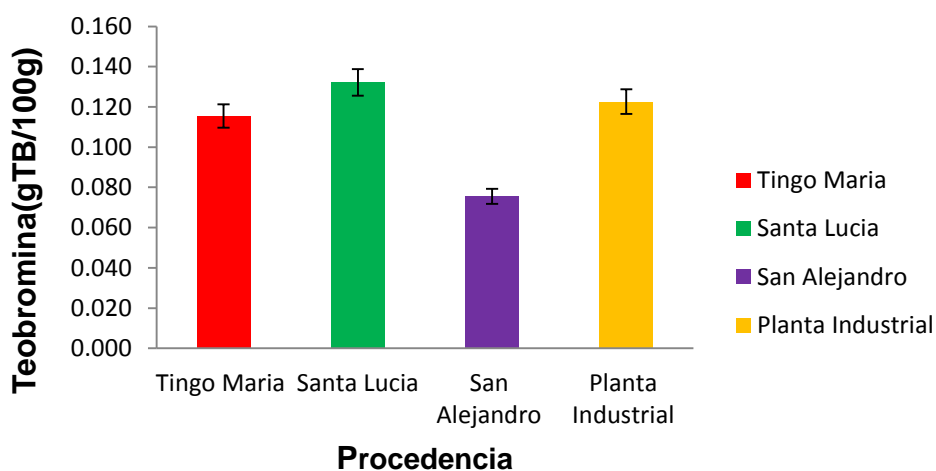


Figura 19. Presentación del contenido de teobromina en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.

4.6.2. Cafeína

En el cuadro 12, se presenta los resultados del contenido de cafeína (CF), los resultados fueron expresados en g de cafeína por 100g de muestra. Los resultados demuestran que la cascarilla de cacao tostado presentó una mayor cantidad de CF en la muestra Tingo María, con un valor entre $0,015 \pm 0,012$ g CF /100g muestra, y los contenidos en las muestras procedentes de Santa Lucia y Planta industrial fueron similares a $0.013 \pm 0,001$ g CF /100g y en la cascarilla San Alejandro el contenido fue menor con un valor de $0,010 \pm 0,002$ g CF /100g, variando las condiciones de extracción (**LUCY, 2013**). En estudios realizados por (**CARLOS, 2014**) el contenido encontrado fue 0.40% de la cafeína, valor superior al encontrado. El análisis estadístico de los resultados de CF (Anexo I, cuadro 35) demostró que no existe diferencia estadística ($p \geq 0,05$).

Cuadro 12. Contenido de cafeína (CF) en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.

Procedencia	Contenido de cafeína (g CF/100g muestra)
Tingo María	$0.015 \pm 0,012$
Santa Lucia	$0.013 \pm 0,001$
San Alejandro	$0.010 \pm 0,002$
Planta Industrial	$0.013 \pm 0,001$

La cantidad de cafeína esta expresado en (g TB/100g muestra) de cascarilla de cacao tostado. Los valores representan el promedio \pm , n=3 repeticiones

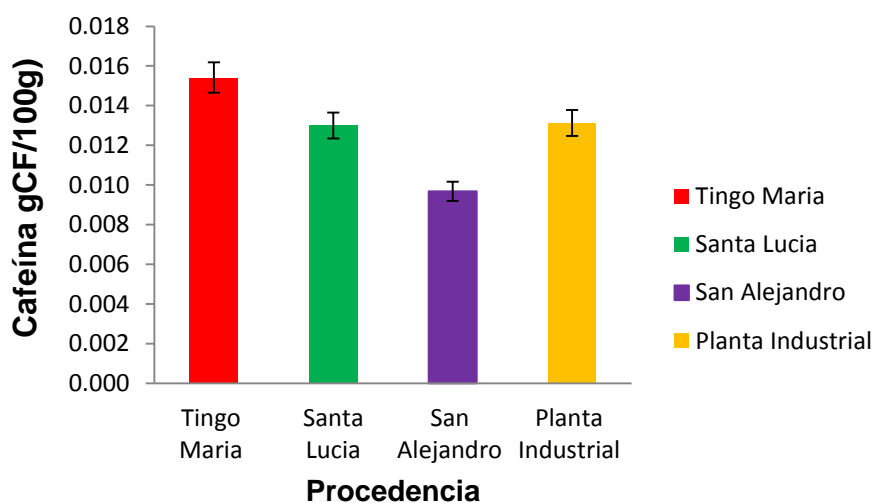


Figura 20. Presentación del contenido de Cafeína en la cascarilla de cacao tostado según su procedencia.

4.7. Contenido de teobroma y cafeína en la infusión del filtrante obtenido

4.7.1. Teobromina

En el cuadro 13 y figura 21 se presentan los resultados del contenido de teobromina en a infusión obtenido, los resultados demuestran que en la infusión obtenido de San Alejandro obtuvo mayor cantidad de teobromina que se observaron entre $0.045 \pm 0,001$ g TB /100mL muestra y el menor cantidad se observó en muestras de infusión de Santa Lucia $0,028 \pm 0,001$ g TB/100mL muestra. En estudios realizado por (**SANDRA et al., 2013**) se presenta el contenido de metilxantinas en los granos de cacao sometidos al proceso fermentativo. El contenido de teobromina varió entre 2,75 y 4,38 mg.g-1 en granos sin fermentar, y 1,24 y 3,32 mg.g-1 en granos fermentados. Según ANOVA (ANEXO-I, cuadro 31) existió diferencia estadística ($p \leq 0,05$) y según prueba de Tukey cuadro 32 todas las muestras son diferentes y el filtrante

procedente de Planta Industrial presentó el contenido de teobromina en la infusión obtenido del filtrante más bajo ($0.022 \pm 0,000$ g TB/100mL muestra).

Cuadro 13. Contenido de teobromina (TB) en la infusión obtenido del filtrante

Procedencia	Contenido de Teobromina (g TB/100mL muestra)
Tingo María	$0.043 \pm 0,001$
Santa Lucia	$0.028 \pm 0,001$
San Alejandro	$0.045 \pm 0,001$
Planta Industrial	$0.022 \pm 0,000$

La cantidad de teobromina esta expresado en (g TB/100mL muestra) de infusión obtenido del filtrante. Los valores representan el promedio \pm , n=3 repeticiones.

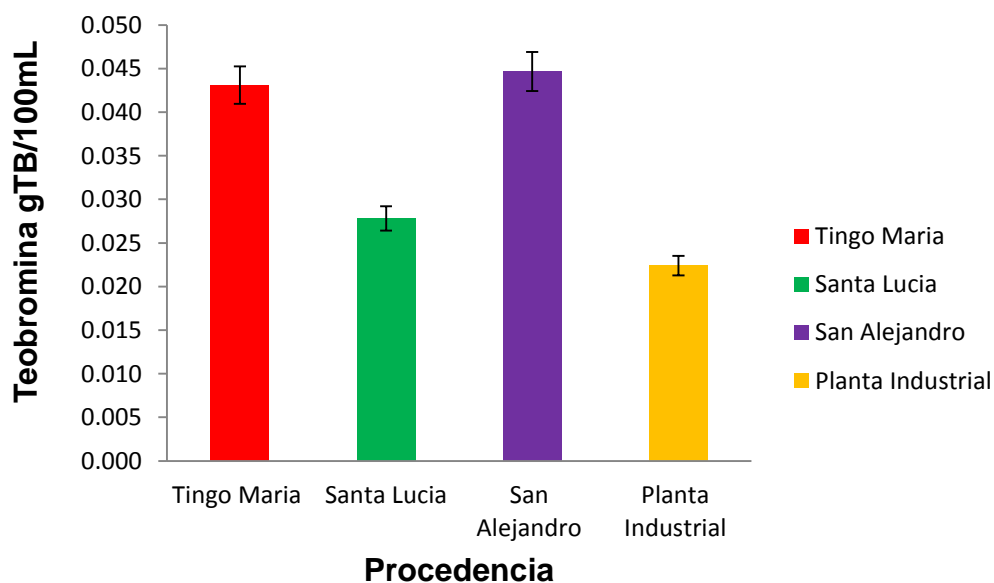


Figura 21. Presentación del contenido de teobromina en infusión obtenido del filtrante

4.7.2. Cafeína

En el cuadro 14 y figura 22, se presentan los resultados del contenido de cafeína obtenido desde la infusión, los resultados fueron expresados en g de cafeína por 100 g de muestra los resultados demuestran en la infusión obtenida varían entre 0,200- 0,564 g TB/100mL muestra. En estudios realizados obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana, Cuantificación de alcaloides por CLAE de los extractos clorofórmicos extracto CHCl₃-US (7,77mg/L) y en extracto CHCl₃-AG (10,31 mg/L) (**OSCAR, 2010**). En estudios realizado en cuantificación de cafeína en la infusión de mate los resultados fueron entre 31,6-83 mg/ mL (**HELENA, 1991**). El análisis estadístico de los resultados de CF (Anexo I, Cuadro 38) demostró que existe un diferencia estadística ($p \leq 0,05$), influyendo en el contenido de CF el factor de zonas. La prueba de Tukey (Anexo I, cuadro 39) todas las muestras son diferentes y contenido de CF en la infusión obtenido de Tingo María presentó el contenido de cafeína más alto $0,564 \pm 0,065$ g CF/100mL muestra.

Cuadro 14. Contenido de cafeína (CF) en la infusión obtenido del filtrante

Procedencia	Contenido de cafeína (g CF/100mL muestra)
Tingo María	0,564± 0,065
Santa Lucia	0,286± 0,010
San Alejandro	0,445± 0,015
Planta Industrial	0,200± 0,008

La cantidad de cafeína esta expresado en (g CF/100mL muestra) de infusión obtenido del filtrante. Los valores representan el promedio \pm , n=3 repeticiones

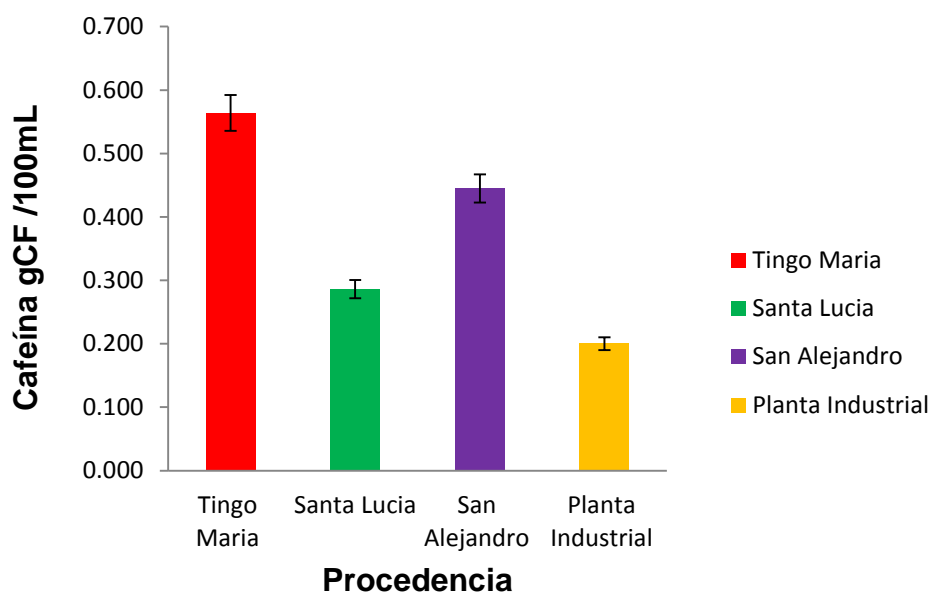


Figura 22. Presentación del contenido de Cafeína en la infusión del filtrante obtenido

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados y discusiones se establecieron las siguientes conclusiones:

- La composición química proximal en la muestra de cascarilla de Planta Industrial presentó los mayores contenidos de humedad 10,05 %, proteína 22,09%, grasa 14,44 % y fibra 15,49 %; la cascarilla de Santa Lucia mostró el mayor contenido de ceniza 10,78 % y la cascarilla de San Alejandro presento el mayor contenido de carbohidratos con 51,75 %.
- Se determinó el mayor contenido de polifenoles en la cascarilla de Santa Lucia con $3,90 \pm 0,049$ g AGE/100g, y el menor contenido correspondió a la cascarilla de Tingo María con $2,67 \pm 0,227$ g AGE/100g.

La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH lo presentó la cascarilla de Tingo maría con $0,23 \pm 0,940$ IC50 mg/mL, disminuyendo en el presente orden: cascarilla de San Alejandro, cascarilla de Santa Lucia y cascarilla de Planta Industrial con $0,36 \pm 0,523$ IC50 mg/mL.

La cascarilla Planta Industrial presento el mayor contenido de antocianina con $0.58 \pm 0,059$ mg cianidina-3-glucosido/g y el menor contenido correspondió a cascarilla de Santa Lucia con $0.23 \pm 0,029$ mg cianidina-3-glucosido/g.

En el análisis por HPLC - RP se utilizó cascarilla de cacao y la extracción de los componentes se realizó con ácido acético 0,3% /metanol (85:15 v/v), utilizando como fase móvil 24,9% metanol, 75,0% agua, 0.1 % Ácido acético; a 35° C, con flujo de 1 mL /min y un volumen de muestra de 20 µL.

El mayor contenido de TB se determinó en la cascarilla de Santa Lucia con $0,132 \pm 0,009$ g TB/100g y en menor contenido en la cascarilla de San Alejandro con $0,076 \pm 0,001$ g TB/100g, existiendo diferencia estadística ($p \leq 0.05$) según su procedencia por zonas.

El mayor contenido de CF se encontró en la cascarilla de Tingo María con $0,015 \pm 0,012$ g CF/100g y las cascarillas de Planta Industrial y Santa Lucia presentaron la misma cantidad de CF con $0,013 \pm 0,001$ g CF/100g. Presentando menor cantidad la cascarilla de San Alejandro con $0,010 \pm 0,002$ g CF/100g; no existió diferencia significativa entre las zonas de procedencia.

- El contenido de teobromina fue mayor en el filtrante elaborado con la muestra de cascarilla de San Alejandro con un contenido de $0.045 \pm 0,001$ g TB/100mL, y el menor contenido de teobromina lo tuvo el filtrante de Planta Industrial con $0.022 \pm 0,000$ g TB/100mL; existió diferencia estadística según las zonas de procedencia de las cascarillas.

El mayor contenido de cafeína tuvo el filtrante procedente de Tingo María con $0.564 \pm 0,065$ g CF/100mL, y el menor contenido de cafeína lo tuvo el filtrante procedente de la Planta Industrial con $0,200 \pm 0,008$ g CF/100mL; existió diferencia estadística entre las infusiones, según la zona de procedencia de las cascarillas.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda estudiar las características químicas de la cascarilla que se cultivan en diferentes departamentos.
- Se recomienda realizar estudios de las propiedades sensoriales de la infusión elaborada a partir de cascarilla de cacao y de esta forma evaluar la aceptabilidad del producto en los consumidores
- Realizar un estudio en el mercado para conocer las necesidades de los consumidores de infusiones y así establecer un segmento del mercado que acepta infusiones de cascarilla de cacao, lo cual sustentaría la producción de esta, favoreciendo de esta manera a la COPAIN.
- Realizar estudios microbiológicos en la cascarilla de cacao para su posterior elaboración del filtrante.

VII. ABSTRACT

Four samples of cocoa husks in the area of Tingo Maria (CTM), San Alejandro (CSA), Santa Lucia (CSL) and Industrial Plant Naranjillo (CPI) were investigated; the proximal chemical composition, total polyphenols (PT), antioxidant capacity (CA), anthocyanins (A), theobromine (Tb), caffeine (Cf) and in the infusion obtained from the filter was determined Tb and Cf. Data were statistically analyzed with a DCA design and Tukey test ($p \leq 0.05$); STATGRAPHICS Centurion XV II software was used. The CPI sample showed higher moisture content 10.05% in CSL greater ash content found 10.78% and the CSA had the highest carbohydrate content of 51.75%. The highest content of PT was presented by the CSL 3.90 ± 0.049 g AGE / 100g. The best CA against DPPH radical was presented by the CTM with 0.23 ± 0.940 IC₅₀ mg / mL. The CPI had the highest content of A with 0.58 ± 0.059 mg cyanidin-3-glucoside / g. The highest content of Tb present CSL 0.132 ± 0.009 g TB / 100g and as many Cf was determined in the CTM 0.015 ± 0.012 g CF / 100g. The filter of San Alejandro (FSA) presented higher content of Tb with 0.045 ± 0.001 g TB / 100 mL and less content the filter Industrial Plant (IPF) with 0.022 ± 0.000 g TB / 100mL; the highest content of CF was presented by FTM with 0.564 ± 0.065 g Cf/ 100 mL and less content FPI 0.200 ± 0.008 g Cf/ 100 mL.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ADRIAZOLA, D. 2003. Producción de los alimentos de los dioses (teobroma cacao L.). Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. p.p .5-8.
- AGUILERA C., HERRERA C., PONCE J. 2010. Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmonideos. Lat. Am. J. Aquat. Res., 38(2): 227.233,
- ANDREW, R., DE SIMONE, F., PIZZA, C., CONTI, C., STEIN, M.1989. Plants metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosydes from Uncaria tomentosa and Guetardaplaypoda.J. of natural products. 52: 679-685.
- ALBORNOZ, A. 1980. Productos naturales. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 616 pp.
- AREVALO, E.2004. Cacao manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonia peruana. Ed. Del Castillo. Chiclayo –Perú. p.115-127.
- BADUI, S.2006. Química de los alimentos.Ed. Por E. Quintanilla .4 ed. México. Pearson educación .736p.

- BARRACAN, A., REY, L. 2004. Establecimiento de núcleos productivos de cacao (*Theobroma cacao*) entorno a microcentrales de beneficio para mejorar la calidad del grano en la región del distrito agroindustrial de Magdalena Caldense. Especialización en gestión de proyectos de desarrollo agroindustrial. Manizales, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 69 p.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995 Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* Pág. 22, 25-30.
- CABRERA, A., ANA, B. 2009. Diseño de Exfoliantes Corporal con Propiedades Antioxidantes a Base de cascara de Semilla de *Theobroma cacao* Nacional. Tesis Ciencias y Tecnología Cosmética. Caracas. Universidad Central de Venezuela. 121 p
- CALLE, S. 2011. Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales. Barcelona .UPC.
- CARPIO, J., JOHANA, M. 2014. Subproductos de cacao como fuente de compuestos antioxidantes. Área Biología Titulación de Ingeniero Químico. Loja-Ecuador. Universidad Técnica Particular de Loja. 75p.
- CARLOS, E. 2014 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. Ingeniero Bioquímico. Ecuador. Carrera Ingeniería Bioquímica. 122 p.

- CONDEZO, O.2011. Polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante (DPPH y peroxilo) en granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) comercial de Tingo María y Tocache. Tesis Ing. Ind .Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 80p.
- CUEVAS, M., ANTEZANA, A., WINTERHALTER, P.2008. Analisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz boliviano. Memorias Red-Alpha-Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena.79-95p.
- CUBERO C., E.1990. Indicadores químicos de la calidad del grano seco de cacao (*Theobroma cacao. L*) y su aplicación. Costa rica. 154p.
- DAZA P. J.F. 2006. Estadística aplicada con Microsoft Excel. Ed. Megabyte S.A.C. Lima, Perú. p. 485 – 516.
- DIN, M., H. YANG, S. XIAO.1999. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. Journal of Chromatography A 849,637-640.
- EFSA. 2008. Europea Food Safety Authority. Theobromine as undesirable substances in animal feed Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. The EFSA Journal , 1-66.
- ELBA, S., MARÍA, J., YOLMAR, V., INGNACIO, B.2014. Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. Archivos Latino Americanos de Nutrición. Venezuela Vol. 64 No 2, 125 a 130p.
- ESPINOZA, C., JOHANNA, D.2014. Potencial de los subproductos de cacao (*Theobroma cacao L.*) y banano (*Musa sapientum*) como fuente de fibra

- dietaría antioxidante. Ingeniero en Industrias Agropecuarias. Loja-Ecuador. Universidad Técnica Particular de Loja. 49p.
- GARZON, G.2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta biol. Colomb., Bogotá, Colombia. 13(3):27-36.
- GIL, A.2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequina en cacao colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis, Mg. Ciencias farmacéuticas. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia.119p.
- GOTTELAND, M.SATURNINO, V.2007. Algunas verdades sobre el café .Rev. chil. Nutr. V. 34 n.2 Santiago junio .2007.
- GRANADO, A.2010. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivo celulares y animales de experimentación. Tesis Doctoral. Madrid Complutense de Madrid.178p.
- HART, L. y FISHER, J. 1991. Análisis Moderno de los Alimentos. Edit. Acribia. Zaragoza, España. 625 p.
- HELENA, P., ELSA, O., PIETRO, F. 1991. Incidencia de la Ingesta de Mate en la Terapéutica con Teofilina. Acta Farm. Bonaerens. Uruguay. 10(2):73-77 p.
- HICKS, J., TORRES, T., SIERRA, V. 2006. Estrés oxidante, concepto y clasificación. Rev. Endocrinology y Nutri.14 – (4): 223-226.
- JULIAN, P.2009 Propiedades físicas químicas de tres variedades del fruto de Anona diversifolia. Tesis ing. En alimentos. Huajuapán de León, México. Universidad Tecnológica del mixteca. 78. P.

- LANGER. S., MARSHALL. L., DAY. J., MORGAN M. R. 2011. Flavanols and methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A Study of the Correlation with Nonfat Cocoa Solids. *J.Agric. Food Chem.* 2011, 59, 8435-8441.
- LARREA, J. 2012. Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario. Tesis Mg. De tecnología y calidad en la industria agroalimentaria. Universidad pública de Navarra. 99p.
- LEON, J. 1968. Fundamentos Botánicos de los cultivos Tropicales IICA, San José, Costa Rica. 375-384p.
- LÓPEZ B. E.A. 2008. Diseño y análisis de experimentos, fundamentos y aplicaciones en agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 176 p.
- MACRE, R., ROBINSON, R., y SALDLER, M. 1993. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition (Vol.7)*. Reino Unido: STAFF. (P.3096-3115; 4521-4541)
- MARQUEZ, E. 2009. Contribución a la biología molecular de los genes antocianidina sintasa (*ans*) y sorbitol deshidrogenasa (*sdh*) en cultivares criollos y trinitarios de *teobroma cacao* L. Tesis Lic. En biología universidad de los Andes. 98p.
- MARTÍNEZ, R., TORRES, P., MENESES, M. A., FIGUEROA, J. G., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A., Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1) 39–45. [En línea]:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>

MENDOZA, C.2012. Las antocianinas del maíz: su distribución en la planta y producción. Tesis maestro en ciencias. Montecillo, Mexico. Esculenta de posgrado de recursos genéticos y prodcutibilidad genética. 130p.

MÉTODO de AOAC.1990. Parte 984.13 pp 74.

NAZARUDDIN, R. 2001. HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products. Malaysian Journal of Analytical Science, Vol. 7, No. 2 (2001) 377-386

LO COCO, F. LANUZZA, F. MICALI, G. CAPPELLANO, G. 2007. Determination of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in by-Products of Cupuacu and Cacao Seeds by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of ChromatographicScience, Vol. 45.

LUCY, J.2013. Teobromina, Cafeína y Catequinas, en granos de cacao de Pucacaca y Huingoyacu e influencia del cacao CCN-51 y del beneficio. Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María- Perú. Universidad Nacional Agraria de la selva.91p.

PALADINO, S.2008.Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (vitisvinifera L.). Tesis Mag. En alimentos (Mención en ciencias). Mendoza, Argentina. Universidades Nacionales de cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.100p.

- PELÁEZ, E. 2009. Actividad antioxidante del extracto en diclorometano de *Palicourea guianensis* Aubl. (Rubiaceae). Tesis ing. Químico. Pereira. Universidad Tecnológica de Pereira. 41p.
- POO, B. 2005. Concentración de Antocianinas en jugo de cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante Nano filtración. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en alimentos. Valdivia –Chile. [En línea]: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uch/2005/fap821c/doc/fap821c.pdf>.
- QUIÑONES, M., MIGUEL M., ALEIXANDRE, M. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutri.Hosp.* Madrid, España. 27(1):76-89.
- ORFA, M. 2014 Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) Criollo y siete clones. Ingeniero en Industrias Alimentarias. Tingo María –Perú. Facultad de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la selva. 108 p.
- OVACO, V., PINEDA, LL. 2011. Los residuos de cacao (*Teobroma cacao* L) como fuente alternativa de antioxidante. Tesis ing. Industrias Agropecuarias. Loja, Ecuador. Universidad Católica de Loja .42p.
- OSCAR, C., MERCEDEZ. A., MIGUEL. G., ADELA. E. 1999. Aprovechamiento de los desechos de cacao (*theobroma cacao* l.) Venezuela. Volumen 11, N° 2. 28-30p.

- OSCAR, A. 2010. Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana. Tecnología Química. Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira. 118 p.
- RAMOS, E., CASTAÑEDA, B., IBÁÑEZ, L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Rev. Acad. Perú Salud, Perú. 15:42-46.
- RIGEL, J. 2005. Procedimiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos. Centro nacional de investigación agrícola, Maracay, Estado de Aragua; Set. 6: 1-4.
- RITCHEY, J. 2002. Estadística para las ciencias sociales. El potencial de la imaginación estadística. Trad. Por Edgar Cosío. 1ed. México. P.467-485.
- RISNER, C. 2008. Simultaneous Determination of Theobromine, (+)- Catechin, Caffeine, and (-)- Epicatechin in Standard Reference Material Baking Chocolate 2384, Cocoa, Cocoa Beans, and Cocoa Butter. Journal of Chromatographic Science, Vol. 46.
- RONAL, E., ELIZABETH, S. 2013. Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. Revista del Encuentro Científico Internacional. Perú. Volume 10 (1): 42-50 p.
- SANDRA, Z., ANGELICA, T., BENJAMÍN, A. 2013. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Colombia vol.18 (3): 391-404p.
- SYMONOWICZ, M.; SYKULA-ZAJAC, A.; LODYGA-CHRUŚCIŃSKA, E.; RUMORA, I.; STRAUKAS, M. 2012. Evaluation of polyphenols and

- anthocyanins contents in black chokeberry - *Photiniamelanocarpa* (Michx.) fruits extract. *Acta Pol Pharm* 69(3): 381-7.
- SOGI, D., SIDDIQ, M., ROIDOUNG, S., DOLAN, K.2012. Total phenolics, carotenoids, ascorbic acid, and antioxidant properties of fresh-cut mango (*Mangifera indica L., Tommyatkin*) as affected by infrared heat treatment. *Food science*. 77(11):1197-1202.
- WAKAO, H. 2002. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao L.*) de producción nacional durante el proceso de beneficio. Tesis Lic. En ciencias químicas. Quito-Ecuador, Universidad Católica del Ecuador. 91 p.
- UGARTONDO, C.2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos en fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. *J. Agric. FoodChem*. Barcelona, España. 54:6945-6950.

IX. ANEXOS

Anexo 01. ANOVA del análisis de humedad

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	71,5838	3	23,8613	2863352,00	0,0000
Intra grupos	0,000066667	8	0,00000833333		
Total (Corr.)	71,5839	11			

Anexo 02. Prueba de Tukey de humedad por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
1	3	2,67667	X
3	3	3,22	XX
4	3	3,73333	X
2	3	3,9	X

Anexo 03. ANOVA del análisis de proteína

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	74,6146	3	24,8715	497430,83	0,0000
Intra grupos	0,0004	8	0,00005		
Total (Corr.)	74,615	11			

Anexo 04. Prueba de Tukey de proteína por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
3	3	16,1767	X
1	3	21,85	X
2	3	21,8567	X
4	3	22,0867	X

Anexo 05. ANOVA del análisis de fibra

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	9,81876	3	3,27292	196375,17	0,0000
Intra grupos	0,000133333	8	0,0000166667		
Total (Corr.)	9,81889	11			

Anexo 06. Prueba de Tukey de fibra por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
3	3	14,6667	X
2	3	15,29	X
4	3	15,49	X
1	3	17,1167	X

Anexo 07. ANOVA del análisis de grasa

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	247,178	3	82,3926	3295702,22	0,0000
Intra grupos	0,0002	8	0,000025		
Total (Corr.)	247,178	11			

Anexo 08. Prueba de Tukey de grasa por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
3	3	2,27333	X
1	3	6,28	X
2	3	10,3833	X
4	3	14,4367	X

Anexo 09. ANOVA del análisis de ceniza

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	12,8834	3	4,29446	257667,33	0,0000
Intra grupos	0,000133333	8	0,0000166667		
Total (Corr.)	12,8835	11			

Anexo 10. Prueba de Tukey de ceniza por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
4	3	8,03	X
3	3	9,47667	X
1	3	10,2533	X
2	3	10,78	X

Anexo 11. ANOVA del análisis de carbohidratos

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	737,48	3	245,827	4214170,86	0,0000
Intra grupos	0,000466667	8	0,0000583333		
Total (Corr.)	737,48	11			

Anexo 12. Prueba de Tukey de carbohidratos por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
4	3	29,91	X
2	3	37,58	X
1	3	40,45	X
3	3	51,7467	X

Anexo 13. ANOVA del análisis de polifenoles

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	2,74649	3	0,915497	11,54	0,0028
Intra grupos	0,634933	8	0,0793667		
Total (Corr.)	3,38143	11			

Anexo 14. Prueba de Tukey de polifenoles por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
1	3	2,67667	X
3	3	3,22	XX
4	3	3,73333	X
2	3	3,9	X

Anexo 15. ANOVA del análisis de DPPH

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	40,7132	3	13,5711	13,50	0,0017
Intra grupos	8,0426	8	1,00533		
Total (Corr.)	48,7558	11			

Anexo 16. Prueba de Tukey de DPPH por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
1	3	9,35667	X
3	3	10,2633	X
2	3	10,65	X
4	3	14,2033	X

Anexo 17. ANOVA del análisis de Antocianina

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	0,159154	3	0,0530515	33,77	0,0027
Intra grupos	0,0062845	4	0,00157112		
Total (Corr.)	0,165439	7			

Anexo 18. Prueba de Tukey de Antocianina por efecto de procedencia

Zona	Casos	Media	Grupos homogéneos
2	2	0,2165	X
1	2	0,25	X
3	2	0,317	X
4	2	0,576	X

Anexo 19. ANOVA del análisis de teobromina de la cascarilla

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	0,005622	3	0,001874	7,86	0,0090
Intra grupos	0,00190667	8	0,000238333		
Total (Corr.)	0,00752867	11			

Anexo 20. Prueba de Tukey de teobromina de la cascarilla por efecto de procedencia

Zonas	Casos	Media	Grupos homogéneos
3	3	0,0753333	X
1	3	0,115333	XX
4	3	0,122333	X
2	3	0,132333	X

Anexo 21. ANOVA del análisis de cafeína de la cascarilla

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	0,0000489167	3	0,0000163056	0,41	0,7530
Intra grupos	0,000321333	8	0,0000401667		
Total (Corr.)	0,00037025	11			

Anexo 22. ANOVA del análisis de teobromina del filtrante

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	0,00109767	3	0,000365889	548,83	0,0000
Intra grupos	0,0000053333	8	6,66667		
Total (Corr.)	0,001103	11			

Anexo 23. Prueba de Tukey de teobromina del filtrante por efecto de procedencia

Zonas	Casos	Media	Grupos homogéneos
4	3	0,0223333	X
2	3	0,028	X
1	3	0,043	X
3	3	0,0446667	X

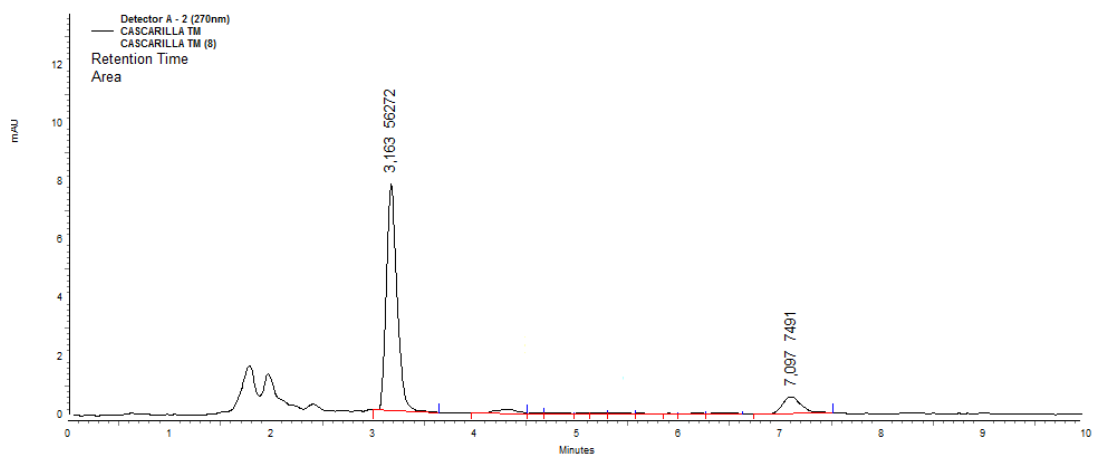
Anexo 24. ANOVA del análisis de cafeína del filtrante

Fuente	SC	GL	CM	Razón- F	Valor P
Entre grupos	0,237165	3	0,079055	69,31	0,0000
Intra grupos	0,00912533	8	0,00114067		
Total (Corr.)	0,24629	11			

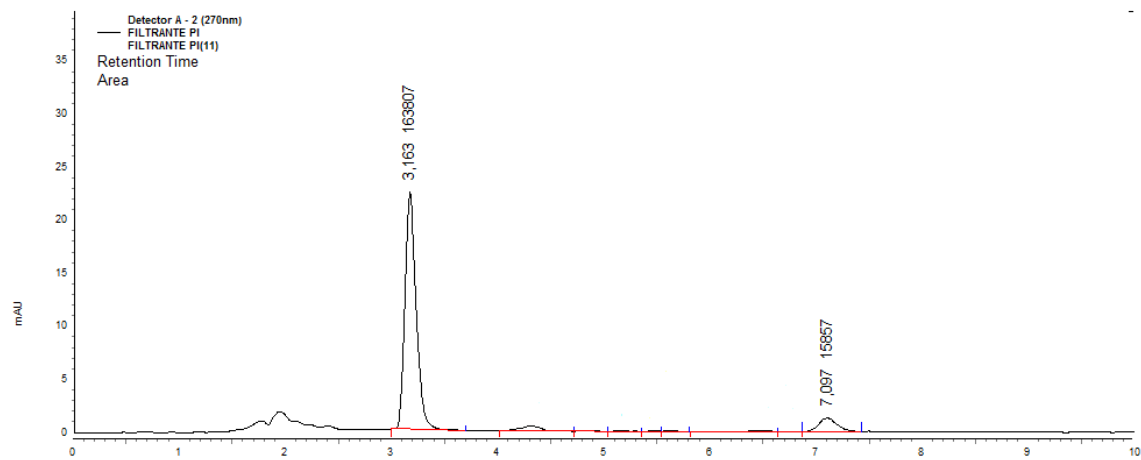
Anexo 25. Prueba de Tukey de cafeína del filtrante por efecto de procedencia

Zonas	Casos	Media	Grupos homogéneos
4	3	0,2	X
2	3	0,286333	X
3	3	0,444667	X
1	3	0,564	X

Anexo 26. Perfil Cromatográfico de la cascarilla



Anexo 27. Perfil cromatográfico del filtrante



Anexo 28. Materia prima**Anexo 29. Proceso de preparación de muestra, para su posterior análisis****Anexo 30. Proceso de análisis químico proximal**

Anexo 31. Proceso de análisis de polifenoles, DPPH, antocianinas**Anexo 32.** Proceso de elaboración de filtrante.**Anexo 33.** Proceso de análisis de teobromina y cafeína por el método de HPLC en cascarilla y filtrante.