

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Evaluación del potencial nutraceutico del cacao clonal CCN-51, cultivado en el
Austro Ecuatoriano**


Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímico
Farmacéutico

Autor:

Daniel Patricio Yanque Tuba

Director:

María Elena Cazar Ramírez

ORCID:  0000-0001-5228-3514

Cuenca, Ecuador

2023-09-01

Resumen

El interés por el consumo de productos bioactivos de origen vegetal se ha incrementado debido a evidencia científica que respalda sus beneficios para la salud. Tanto el cacao como el chocolate contienen diversos compuestos bioactivos como polifenoles, específicamente flavanoles, antocianinas y proantocianidinas. Estas moléculas exhiben actividad antioxidante y están relacionadas con la prevención, supresión y progresión de las enfermedades no transmisibles. El cacao CCN-51 posee características de astringencia y amargor, lo cual indica un contenido significativo de polifenoles, compuestos de bioactividad promisorio. El objetivo de la presente investigación fue revalorizar el cacao CCN-51 y sus productos elaborados por agricultores del Austro Ecuatoriano, mediante la evaluación del potencial antioxidante y capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, en extractos orgánicos de cacao CCN-51, obtenido en sus diferentes etapas de procesamiento. Este trabajo se enmarcó en el proyecto CEPRA XVI-2022-20 "Perfil de flavan-3-oles y compuestos polifenólicos en cacao CCN-51, utilizado en la preparación de chocolate artesanal en el austro ecuatoriano: Sello distintivo y propiedades funcionales". Se realizaron ensayos espectrofotométricos, para la determinación de polifenoles totales y flavonoides. La actividad antioxidante se estimó por la captura de los radicales libres ABTS^{•+} y DPPH[•]. Además, se evaluó la capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, involucrada en el metabolismo post-prandial de glucosa. Los resultados obtenidos muestran que el procesamiento post-cosecha del cacao incide en la disminución significativa en el contenido de polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.

Palabras clave: chocolate, Theobroma cacao, polifenoles, actividad antioxidante



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The interest in the consumption of bioactive products of vegetable origin has increased due to scientific evidence that supports their health benefits. Both cocoa and chocolate contain various bioactive compounds such as polyphenols, specifically flavanols, anthocyanins, and proanthocyanidins. These molecules exhibit antioxidant activity and are related to the prevention, suppression, and progression of noncommunicable diseases. CCN-51 cocoa has astringency and bitterness characteristics, which indicates a significant content of polyphenols, compounds with promising bioactivity. The objective of this research was to revalue CCN-51 cocoa and its products made by farmers of the Ecuadorian Austro, by evaluating the antioxidant potential and inhibitory capacity of the α -glucosidase enzyme, in organic extracts of CCN-51 cocoa, obtained in its different stages of processing. This work was part of the CEPRA XVI-2022-20 project "Profile of flavan-3-ols and polyphenolic compounds in cocoa CCN-51, used in the preparation of artisanal chocolate in southern Ecuador: Distinctive seal and functional properties". Spectrophotometric tests were carried out for the determination of total polyphenols and flavonoids. The antioxidant activity was estimated by the capture of the free radicals ABTS^{•+} and DPPH[•]. In addition, the inhibitory capacity of the α -glucosidase enzyme, involved in postprandial glucose metabolism, was evaluated. The results obtained show that the post-harvest processing of cocoa affects the significant decrease in the content of polyphenols, flavonoids, antioxidant activity and inhibitory capacity of the α -glucosidase enzyme.

Keywords: chocolate, Theobroma cacao, polyphenols, antioxidant activity



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	10
Objetivos.....	12
1. Marco teórico.....	13
1.1. Generalidades del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	13
1.1.1. Características botánicas	13
1.1.2. Variedades de cacao.....	14
1.2. Polifenoles	16
1.2.1. Flavonoides.....	18
1.2.2. Polifenoles en cacao	19
1.2.3. Beneficios del consumo de polifenoles.....	19
1.3. Actividad antioxidante	21
1.3.1. Radicales libres	21
1.3.2. Ensayos espectrofotométricos.....	22
1.4. Inhibición enzimática.....	22
1.4.1. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa	22
2. Materiales y métodos	23
2.1. Obtención de muestras.....	23
2.2. Preparación de extractos enriquecidos en polifenoles	24
2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	24
2.3.1. Análisis del contenido de polifenoles totales.....	24
2.3.2. Análisis del contenido de flavonoides totales.....	25
2.4. Determinación de la capacidad antioxidante	25
2.4.1. Ensayo ABTS ^{•+}	26
2.4.2. Ensayo DPPH [•]	26
2.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de enzimas involucradas en el desarrollo de ENT	27
2.5.1. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa	27
2.6. Análisis estadístico	27

3. Resultados y discusión.....	28
3.1. Determinación de polifenoles totales	28
3.2. Determinación de flavonoides totales	30
3.3. Determinación de la capacidad antioxidante	33
3.4. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa.....	36
4. Conclusiones y recomendaciones	39
4.1. Conclusiones	39
4.2. Recomendaciones	39
Referencias.....	40
Anexos.....	47

Índice de figuras

Figura 1. Fruto de <i>Theobroma cacao</i> L. .	14
Figura 2. <i>Theobroma cacao</i> L clonal CCN-51 cultivado en el austro ecuatoriano. A) Plantín de cacao cultivado en vivero, próximo a ser trasplantado. B) Frutos de cacao. C) Parte interna del fruto, se aprecia el mucilago (blanco), cascarilla (café) y semilla aplanada elipsoide (negro).	16
Figura 3. Tipos de polifenoles y subclasificación de flavonoides..	17
Figura 4. Estructura básica y distintos tipos de flavonoides.....	18
Figura 5. Principales flavonoides presentes en granos de cacao..	19
Figura 6. Contenido fenólico total durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.	30
Figura 7. Contenido total de flavonoides durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.....	32
Figura 8. Actividad de eliminación de radicales catiónicos ABTS ^{•+} durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.	35
Figura 9. Actividad de eliminación de radicales DPPH [•] durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.	35
Figura 10. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.	37

Índice de tablas

Tabla 1. Contenido de fenoles totales durante el proceso de post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador), expresados en miligramos de equivalente de ácido gálico por 100 gramos de peso seco (mg EAG/100 g p.s.).	28
Tabla 2. Contenido total de flavonoides durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador), expresados en miligramos de equivalente de quercetina por 100 gramos de peso seco (mg EQ/100 g p.s.).....	31
Tabla 3. Determinación de la capacidad antioxidante mediante la actividad de eliminación de radicales catiónicos ABTS ^{•+} y DPPH [•] , durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador). Valores de ABTS ^{•+} expresados en miligramos de ácido ascórbico por gramo de peso seco. Valores de DPPH [•] expresados como porcentaje de eliminación.....	33
Tabla 4. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador), expresados como porcentaje de inhibición.....	36

Dedicatoria

Este trabajo de titulación lo dedico a mis padres Narcisa y Patricio, que con su amor me han brindado la oportunidad de crecer como persona y ser humano, siendo para mí un ejemplo a seguir y donde puedo encontrar amor, refugio y apoyo.

A mi hermana Liliana, con quien espero que Dios me permita seguir compartiendo grandiosos momentos.

Agradecimientos

Primeramente, a Dios, que me ha bendecido extensamente durante mi recorrido en la vida y por lo que siempre estaré agradecido.

A mis padres y familiares que mediante su apoyo constante me han permitido seguir adelante y proporcionarme un futuro prometedor.

A la Dra. María Elena Cazar, directora de tesis, por haber brindado su apoyo, conocimientos, tiempo y paciencia, para la realización de este trabajo de titulación.

A los docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca, por brindarme sus conocimientos durante estos años de aprendizaje, que serán de importante utilidad para afrontar los retos que conlleva la vida laboral.

Finalmente, a la Universidad de Cuenca, que me ha permitido tener acceso a una educación de calidad mediante sus profesores, personal administrativo e instalaciones y así titularme en la carrera que me apasiona.

Introducción

En los últimos años, el interés por el consumo de productos bioactivos de origen vegetal se ha incrementado debido a que existe numerosa evidencia científica que respalda sus beneficios para la salud (Belščak et al., 2009). Entre ellos se encuentran cualidades nutricionales como la protección de las células frente al estrés oxidativo y en la regulación de la respuesta inflamatoria; lo que permite prevenir, suprimir y mitigar la aparición y progresión de diversas enfermedades no transmisibles (Carrillo et al., 2014).

Es así que el consumo de productos derivados del cacao ha aumentado en el mercado alimenticio, ya que éstos poseen una amplia aceptación por sus cualidades organolépticas y el creciente conocimiento de la presencia de una gran variedad de compuestos bioactivos, entre los que se incluye a los polifenoles, los cuales poseen una gran actividad antioxidante (Carrillo et al., 2014; Cheng et al., 2017).

El chocolate es el producto más popular de los elaborados del cacao. Este producto contiene en su composición diversos tipos de polifenoles procedentes de los granos de cacao, principalmente flavanoles o flavan-3-oles, antocianinas y proantocianidinas (Fraga et al., 2019). Estos compuestos, además de poseer actividad antioxidante están relacionados con diversos beneficios para la salud como modulador de la presión arterial y de perfiles lipídicos. Lo que sugiere efectos en la reducción del riesgo de eventos cardiometabólicos incluyendo infarto de miocardio, enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y diabetes (Tan et al., 2021).

Para la obtención del chocolate, los granos de cacao pasan por un largo proceso que incluye fermentación, secado, tostado, molienda, refinación, conchado y templado lo que garantiza su sabor y estabilidad. Las condiciones a las cuales se desarrollan estos procesos alteran en gran medida la composición final del chocolate (Borja et al., 2022).

El origen, domesticación y uso del cacao se remonta hace 5.300 años en la amazonia Ecuatoriana y posteriormente hace 3000 años en Mesoamérica. En la actualidad el árbol del cacao es cultivado en zonas tropicales de África, Asia y Sudamérica, en un área denominada “cinturón de cacao” que comprende una latitud entre 10° al sur y 20° al norte, las cuales reúnen las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo y explotación agrícola (Verna, 2013). En el mundo se cultiva principalmente tres variedades de *Theobroma cacao* L: Forastero, Criollo y Trinitario, exportándose alrededor de 4,7 millones de toneladas. El principal exportador es África con el 66 %, seguido de Asia con el 17,5 % y América Latina y el Caribe participa con el 15 % (Montagna et al., 2019; Vargas et al., 2021).

Ecuador es el tercer productor cacaotero en el mundo ya que aporta con el 8 % de la producción y es el primer productor de cacao fino de aroma con el 65 % del mercado (Vargas et al., 2021). En el Ecuador se cultiva y se exportan dos variedades, el “Nacional” o “cacao arriba” y el clon “CCN-51”, los cultivos de cacao se encuentran distribuidos en las tres regiones del Ecuador, un 84 % en la costa, un 8 % en la sierra y un 8 % en el oriente (ProEcuador, 2015).

El cacao clonal CCN-51 posee ventajas agronómicas que incluyen una alta productividad, resistencia a enfermedades y menores requerimientos para su cultivo, en comparación con el cacao Nacional (no necesita de sombra y no requiere polinización cruzada). Esta es la razón por la cual es ampliamente cultivado en Ecuador llegando a representar el 72 % de las exportaciones de granos de cacao (Redacción El Universo, 2021).

A pesar de las ventajas que presenta el cultivo del clon CCN-51, es considerado un cacao a granel por características tales como su sabor amargo, elevada acidez, sabores verdes indeseables, astringencia y bajo sabor frutal, siendo internacionalmente cotizado a precios bajos (Jaimez et al., 2022). Estas propiedades organolépticas de astringencia y tonos amargos se atribuyen a la presencia de flavonoides y compuestos polifenólicos, que al consumirlos confieren grandes beneficios a la salud (Jaimez et al., 2022; Ortega et al., 2010). Debido a esto, estudiar el clon CCN-51 cultivado en la zona sur del Ecuador en las estribaciones del Macizo del Cajas permitirá conocer específicamente el contenido total de polifenoles, flavonoide, actividad antioxidante y capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, en sus diferentes etapas de procesamiento, que incluye grano fresco, grano fermentado, grano seco y licor de cacao.

Los datos obtenidos por este estudio se proyectan a dar un valor agregado a los productos tanto de cacao beneficiado como de chocolate, producido por artesanos de la zona sur del Ecuador pertenecientes a la Asociación Zhucay. Además, en un antecedente para futuras intervenciones especialmente en la optimización de cada uno de los procesos de elaboración de chocolate artesanal con el fin de garantizar un mayor contenido de polifenoles en el producto final, así como de sus beneficios al ser consumido.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el potencial antioxidante e inhibitorio de enzimas involucradas en el mecanismo de enfermedades no transmisibles, de extractos orgánicos de cacao CCN-51, obtenido en sus diferentes etapas de procesamiento.

Objetivos Específicos

- Probar el potencial nutracéutico del cacao CCN-51, utilizado en la elaboración de chocolate artesanal por productores de la parroquia Zhucay, ubicada en las estribaciones del Macizo del Cajas.
- Establecer una metodología de trabajo enfocada a la evaluación del potencial nutracéutico de cacao y derivados, mediante ensayos espectrofotométricos.

1. Marco teórico

1.1. Generalidades del cacao (*Theobroma cacao* L)

En 1753 Carl Von Linné un naturalista sueco nombró al árbol de cacao con el nombre científico *Theobroma cacao*, que provienen de la unión de la palabra latina *Theobroma* traducido como alimento de los Dioses y la palabra azteca *xocolatl* compuesta por dos significados: *xococ* (amargo) y *atl* (agua) (Arteaga, 2013; Montagna et al., 2019).

El registro arqueológico constata que en la amazonia ecuatoriana en la localidad de Santa Ana – La Florida perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe se empezó a usar y domesticar el cacao hace 5.300 años, por los antiguos pobladores de lo que hoy se conoce como la cultura Mayo Chinchipe (Abad et al., 2020; Jaimez et al., 2022).

Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO) en el periodo de 2016 a 2017 a nivel mundial se produjeron 4 739 000 toneladas, de las cuales 3 622 000 toneladas fueron producidas en África (Montagna et al., 2019). A su vez, Ecuador exportó 236 mil toneladas de granos de cacao en 2015 (ProEcuador, 2015).

En la actualidad la planta de cacao es cultivada en diversos países, los mayores productores son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brasil, Camerún, Ecuador, República Dominicana y Papúa Nueva Guinea (Verna, 2013).

1.1.1. Características botánicas

El árbol de cacao pertenece a la familia *Malvaceae*, subfamilia *Sterculioidae* y donde existen 22 especies; el hábitat natural del árbol de cacao es en el interior de las selvas tropicales con temperaturas de 32°C a 18°C, una humedad relativa del 100 % al 70 %. Alcanza una altura de 12 metros, produce sus frutos a partir de los 5 años de edad y alcanza su rendimiento máximo a los 10 años. El fruto, vaina o mazorca son bayas con un duro y espeso exocarpo de 7-20 mm de grosor, al madurar su coloración puede variar del amarillo/marrón al morado, que en su interior alberga de 20 a 40 granos de cacao, almendras o semillas de un largo de 2-4 cm con un cuerpo aplanado elipsoide rodeado de una pulpa blancuzca o mucílago compuesta por un 82-87 % de agua, 10-15 % de azúcares, 2-3 % de pentosanas, 1-3 % de ácido cítrico y un 1-1,5 % de pectina. En un año un árbol produce de 20 a 50 vainas (Vásquez et al., 2016; Verna, 2013).



Figura 1. Fruto de *Theobroma cacao* L. (Fuente: Redacción El Universo, 2021).

1.1.2. Variedades de cacao

Theobroma cacao L es una especie vegetal domesticada, la cual originó tres cultivares Forastero, Criollo y Trinitario. Esta clasificación general toma en cuenta cualidades propias de cada variedad como su morfología, características agronómicas, moleculares y marcadores genéticos. Existe un constante mejoramiento, mediante el cruce de diferentes linajes genéticos con los objetivos de obtener mayores rendimientos y resistencia a plagas (Dostert et al., 2012).

El cultivar Forastero es clasificado como un cacao ordinario empleado en la fabricación de manteca de cacao y productos a base de chocolate. Las cultivares Criollo, Trinitario y Nacional son clasificados como cacaos finos o de aroma, muy apreciados por sus características organolépticas, habitualmente son mezclados con Forastero para la obtención de sabores específicos (Centro de Comercio Internacional, 1991).

- **Forastero:** Es originario de la cuenca superior del río Amazonas, es la principal variedad de cacao cultivada a gran escala mundialmente. Posee características agronómicas destacables como una gran productividad, resistencia a enfermedades y plagas comparado a otras variedades de cacao; por esta razón, es usado ampliamente por la industria chocolatera debido a su alta disponibilidad y consistencia. Los frutos son de cáscara dura y leñosa de un color verde a marrón. Los granos son de color morado, aplanados, poseen un sabor fuerte y robusto con intenso sabor a chocolate, ligeros sabores terrosos y con acentuado amargor. Ampliamente cultivado en las regiones cacaoteras de Brasil, África Occidental, América Central y el Caribe. La producción mundial de esta variedad es alrededor del 80 % (Dostert et al., 2012; Hall et al., 2010).
- **Criollo:** Originario de Centro América, probablemente fue domesticado por los Mayas aproximadamente hace 3000 años. A pesar de que es un cacao muy apreciado por la

industria del chocolate por su alta calidad con un perfil de sabor único, solamente representa el 5 % de la producción mundial de cacao, debido principalmente a su bajo rendimiento, susceptibilidad a plagas, enfermedades y cambios ambientales. Los frutos son pequeños, redondeados de color marrón rojizo con una cáscara suave, posee diez surcos longitudinales de los cuales cinco están bien marcados, los lomos son irregulares, prominentes y verrugosos. Los granos son de color blanco a violeta, redondos de un sabor dulce, aromático, afrutado con tonos sutiles a nueces, posee bajo amargor y astringencia, su aroma es descrito como intenso, agradable, floral y con toques de vainilla. Es producido en México, Venezuela, Colombia, Nicaragua y Guatemala. La producción mundial de esta variedad se estima de un 5 al 10 % (Afoakwa, 2010; Dostert et al., 2012).

- **Trinitario:** Se trata de un híbrido entre Forastero y Criollo, su origen se remonta alrededor del año 1730 en la isla Trinidad. Resalta por su notable rendimiento y baja susceptibilidad a plagas y enfermedades. Los frutos son largos rojos en un inicio y al madurar su tonalidad pasa a ser amarillo. Los granos son de tamaños diversos, de un color purpura, rojo, amarillo o marrón; poseen un sabor y aroma fuerte a chocolate con tonalidades frutales, florales y a nuez. Es cultivado en Colombia, Venezuela, México, el Caribe y Asia (Pereira, 2015; Sukha et al., 2008).
- **Nacional:** Es una variedad especial de cacao cultivado exclusivamente en Ecuador. Reconocido mundialmente por sus excelentes características organolépticas con el cual se elaboran chocolates finos de especialidad de calidad premium (Abad et al., 2020; Jaimez et al., 2022). Originario de la Amazonia alta perteneciente a Ecuador. Frutos grandes color amarillo intenso, cáscara rugosa con surcos bien pronunciados. Los granos son de color morado claro, el mucilago es algo escaso y muy dulce. De un sabor muy distintivo, complejo, floral y de carácter afrutado, que incluyen notas a jazmín, nueces bayas y en ocasiones a toques de especias. Su aroma desprende fragancias frutales y florales. Cultivado principalmente en las provincias de Guayas, Los Ríos, Esmeraldas, Manabí, El Oro y Santo Domingo (Abad et al., 2020).
- **Cacao clon CCN-51:** En Ecuador desde 1940 empezaron a surgir una gran variedad de cultivares de cacao debido a la hibridación de cacaos Nacionales, cultivares trinitarios, venezolanos y amazónicos. De esta manera, a finales de la década de 1950 en Ecuador se empezó con programas de mejoramiento para obtener clones de alto rendimiento, impulsado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), pero también por iniciativas personales y empresas privadas (Jaimez et al.,

2022; Ortega et al., 2010).

En 1950, la expedición del agrónomo ambateño Homero Castro Zurita al valle de Canelos en la Amazonía ecuatoriana permitió adicionar material de cacao a su colección privada llamada “Colección Castro Naranjal” o CCN, en 1960 logró cruzar (ICS-95 × IMC-67) × “Oriente 1” (del valle de Canelos) dando origen al clon CCN-51. Este clon posee ventajas agronómicas de interés como una alta productividad, maduración temprana, no necesita de sombra, no requiere polinización cruzada y presenta una alta tolerancia a enfermedades. Al poseer estas características, fue cultivado en Ecuador masivamente a partir de 1985, para el 2005 representó un 5,8 % de las exportaciones de cacao, en el 2015 llegó a representar el 30 % y en la actualidad ha llegado a representar el 72 % de las exportaciones de granos de cacao. Los rendimientos estimados para el CCN-51 es de 1300-1800 Kg/ha. Con el tiempo su cultivo se expandió a Colombia, Perú, Brasil y países de centro América como Guatemala (Jaimez et al., 2022; Redacción El Universo, 2021).

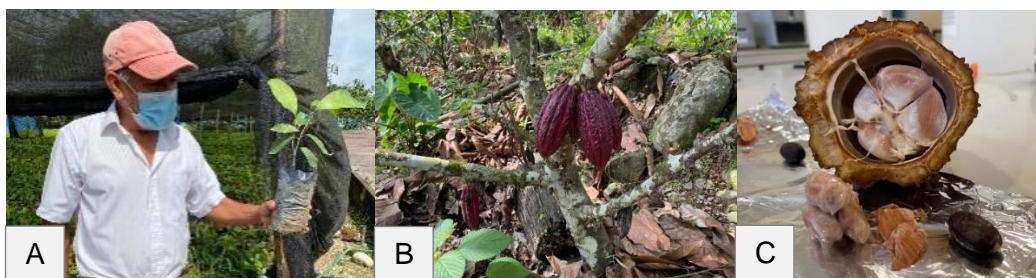


Figura 2. *Theobroma cacao* L clonal CCN-51 cultivado en el austro ecuatoriano. A) Plantín de cacao cultivado en vivero, próximo a ser trasplantado. B) Frutos de cacao. C) Parte interna del fruto, se aprecia el mucilago (blanco), cascarilla (café) y semilla aplanada elipsoide (negro).

1.2. Polifenoles

Las plantas vasculares se originaron en ambientes acuáticos y a lo largo de su evolución han desarrollado la capacidad de síntesis de compuestos fenólicos, necesarios para su adaptación a los distintos ecosistemas terrestres (Croteau et al., 2015). Estas biomoléculas se encuentran en diferentes tejidos vegetales, como hojas, flores, nueces, tallos, cortezas, epidermis, frutos, cubiertas de semillas y raíces. Son sintetizadas mediante el metabolismo secundario de los vegetales por las vías del fenilpropanoide (shiquimato) y del acetato de fenilpropanoide (Aron & Kennedy, 2008).

Los polifenoles cumplen diversas funciones biológicas como la de atraer polinizadores ya que son pigmentos naturales que dan color a las flores; también, confieren características

organolépticas de sabor y olor a frutos (Fraga et al., 2019). Poseen funciones estructurales en las células vegetales, son parte de las paredes celulares que otorgan características específicas a las distintas maderas y cortezas, en particularidad son responsables del color, durabilidad y resistencia, esta última esencial para soportar peso; además, permiten el transporte de agua y minerales desde las raíces a las hojas (Croteau et al., 2015). Son especialmente útiles en funciones de defensa, al brindar protección frente a organismos exógenos perjudiciales como bacterias, hongos, insectos y animales herbívoros. En el caso de invasión microbiana actúan en el metabolismo, reproducción y crecimiento de los mismos; poseen la capacidad de quelar metales como el hierro disminuyendo su biodisponibilidad limitando el crecimiento de microorganismo (Aron & Kennedy, 2008). Asimismo, defienden a las plantas frente al ataque de herbívoros debido a sus características amargas y astringentes. Adicionalmente protegen a los tejidos vegetales frente a la radiación ultravioleta y actúan como antioxidantes (Bertelli et al., 2021).

Los polifenoles estructuralmente incluyen a moléculas que contienen uno o más anillos aromáticos unidos a uno o más hidroxilos; Además, poseen otros grupos funcionales como metil-ésteres, ésteres, glicósidos, ácidos y alcoholes fenólicos, entre otros. Se clasifican principalmente en los siguientes grupos: flavonoides, cumarinas, estilbenos, ácidos fenólicos, fenoles simples, lignanos, taninos hidrosolubles, neolignanos, quinonas e isocumarinas (Fraga et al., 2019; Šturm & Poklar, 2020).

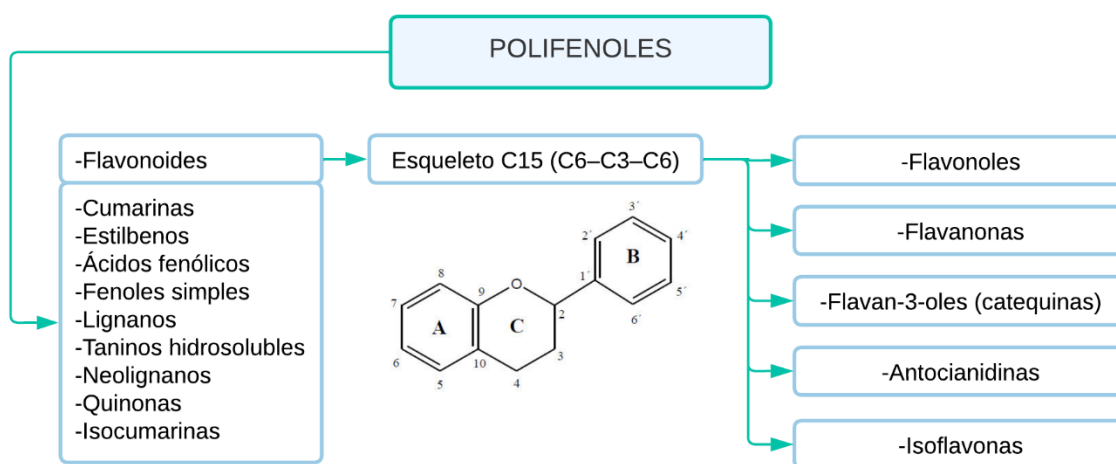


Figura 3. Tipos de polifenoles y subclasificación de flavonoides. (Fuente: Cartaya & Reynaldo, 2001; Croteau et al., 2015).

1.2.1. Flavonoides

Es uno de los grupos más investigados por sus múltiples beneficios en la salud humana. Se sabe que existen por lo menos 8.000 compuestos fenólicos, de los cuales 4.500 pertenecen a la subclase de los flavonoides, de allí su importancia. Estas moléculas pueden encontrarse como monómeros, dímeros y oligómeros superiores. (Croteau et al., 2015; Šturm & Poklar, 2020).

Se caracterizan por compartir una estructura química común tipo fenilbenzopirano. La estructura química general básica comprende un esqueleto C15 (C6–C3–C6), conformada por dos anillos de benceno (A y B) unidos a un anillo pirano heterocíclico (C). Los flavonoides se subdividen de acuerdo a los diferentes sustituyentes dentro del esqueleto básico, así como en el grado de insaturación y oxidación del anillo C en: flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-oles (catequinas) y antocianidinas (Cartaya & Reynaldo, 2001; Croteau et al., 2015).

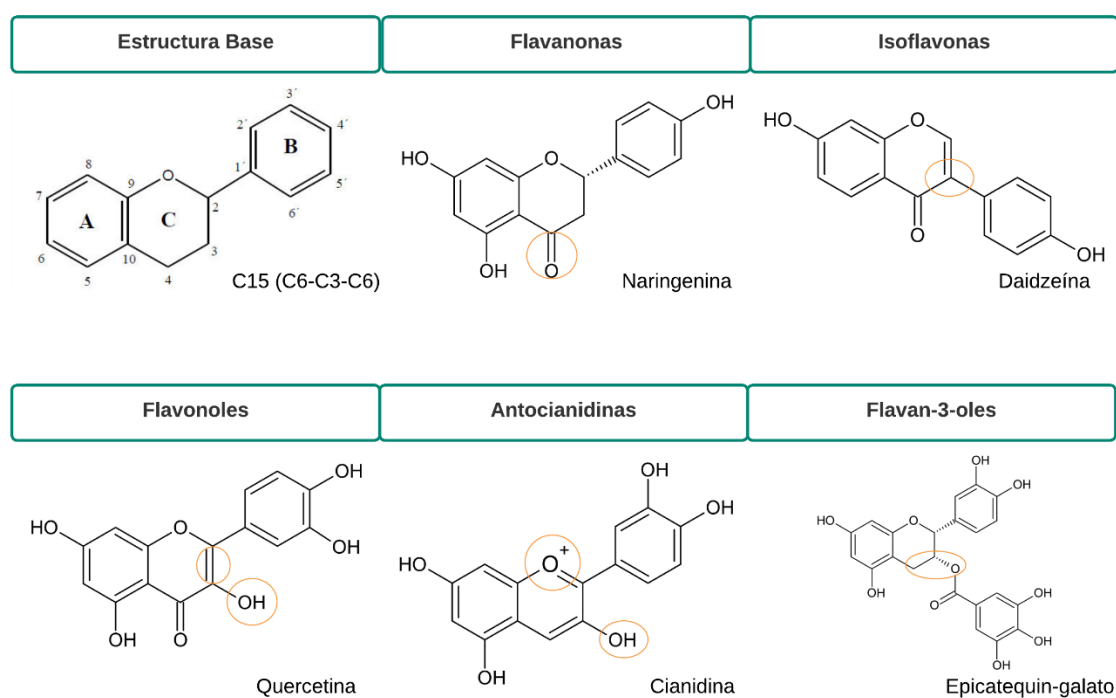


Figura 4. Estructura básica y distintos tipos de flavonoides. (Fuente: Croteau et al., 2015; Kim et al., 2016).

1.2.2. Polifenoles en cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L) y sus derivados poseen una gran variedad de compuestos bioactivos, entre los que se incluye a los polifenoles. Del 10 al 12 % del peso seco del grano de cacao entero está compuesto de polifenoles (Jalil & Ismail, 2008; Samanta et al., 2022). Entre estos compuestos se pueden reconocer tres grupos de polifenoles: 1) catequinas o flavan-3-oles que corresponden aproximadamente al 37 %, 2) las antocianinas son un 4 % y 3) las procianidinas un 58 %. Todas comparten como rasgo distintivo en común una estructura tipo flavonoide (Aron & Kennedy, 2008; Ortega et al., 2010). Entre los monómeros más relevantes de flavan-3-oles se encuentran la (-)-epicatequina y (+)-catequina; adicionalmente, se hallan los oligómeros procianidinas de tipo B que se encuentran unidas por enlaces C4-C8 (Tan et al., 2021; Watanabe et al., 2014; Stanley et al., 2018).

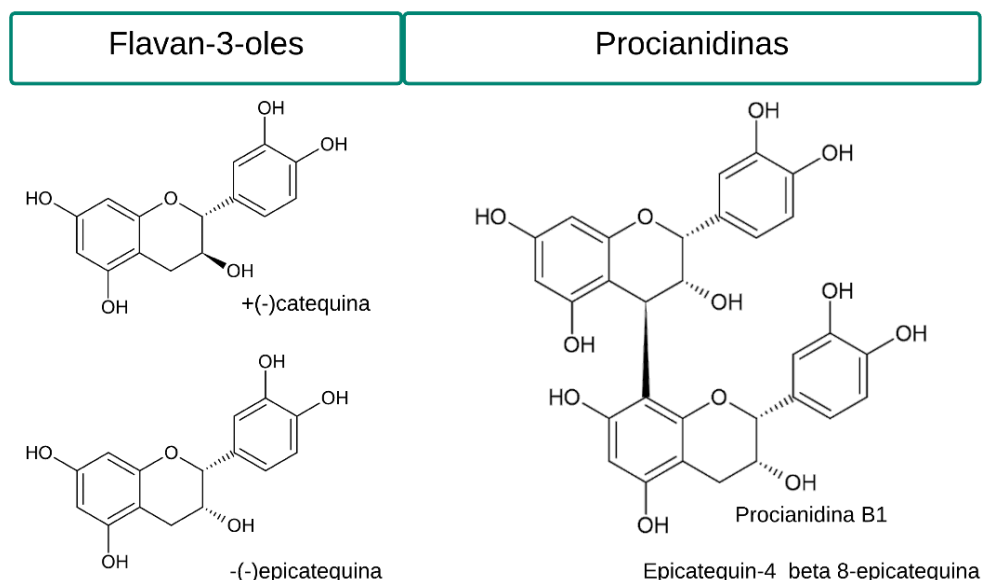


Figura 5. Principales flavonoides presentes en granos de cacao. (Fuente: Croteau et al., 2015; Stanley et al., 2018).

Los oligómeros y polímeros de los flavan-3-oles corresponden a los taninos condensados o procianidinas. Las antocianinas son pigmentos característicos presentes en las vacuolas de las vainas de cacao que permite su dispersión (Croteau et al., 2015).

1.2.3. Beneficios del consumo de polifenoles

Los polifenoles son un grupo de moléculas con actividad antioxidante relevantes, debido a su estructura compuesta por uno o más radicales fenólicos. Cumplen múltiples funciones en el organismo como: efectos antioxidantes, eliminación del anión superóxido y peroxinitrito, quelación de metales de transición, efectos antiplaquetarios, antiinflamatorios, aumento de HDL sérico y reducción de LDL sérico, intervienen en la glucoregulación, modulación en la

síntesis de mediadores inflamatorios como citoquinas, FNT- α , interleucina 1- β e IL-6. Por este motivo son sustancias potencialmente útiles contra el cáncer, enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas (Aron & Kennedy, 2008; Cheng et al., 2017; Fraga et al., 2019; Racine et al., 2019).

Los principales beneficios del consumo de derivados de cacao ricos en polifenoles son:

- **Efecto cardiovascular:** Principalmente debido al aumento en la actividad y niveles de óxido nítrico sintasa endotelial y reducción de la xantina oxidasa, lo que aumenta la actividad y niveles de óxido nítrico (NO) bioactivo, ocasionando una vasodilatación, mejorando el tono vascular y reduciendo la presión arterial sistólica y diastólica (Pucciarelli, 2013). Unos 897 mg de epicatequina y procianidinas disminuyen la adhesión plaquetaria, al reducir la expresión inducida por ADP y adrenalina. Además, los polifenoles pueden contribuir en una reducción del colesterol LDL y a la elevación del colesterol HDL ocasionando un cambio positivo en los marcadores de riesgo de ECV (Ried et al., 2017; Pucciarelli, 2013)
- **Homeostasis de la glucosa:** Los flavonoides retardan la asimilación y absorción de los carbohidratos al inhibir enzimas digestivas como α -amilasa y α -glucosidasa. Mejoran la absorción de glucosa mediada por insulina, previniendo el daño tisular por estrés oxidativo e inflamación asociado a la diabetes. El consumo de flavonoides potencialmente previene y contribuye al tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Kim et al., 2016).
- **Obesidad:** El consumo de chocolate genera saciedad y reducción del apetito. Así mismo, los flavonoides pueden inducir la reducción de lipogénesis, inducen lipólisis y promueve la secreción de adiponectina; estos mecanismos disminuyen el depósito de lípidos y la resistencia a la insulina (Montagna et al., 2019).
- **Sistema nervioso central:** La ingesta de 100 g de chocolate amargo con un 72 % de cacao está relacionado con posibles beneficios a nivel del sistema nervioso central y funciones neurológicas relacionadas con la producción de NO, conduciendo a una vasodilatación y consiguiente aumento del flujo sanguíneo cerebral, mejorando el aporte de oxígeno y glucosa a las neuronas, esto lleva al aumento en la angiogénesis en el hipocampo, disminuyendo el riesgo de deterioro cognitivo. Algunos trastornos neurodegenerativos ocasionados por la acumulación de especies reactivas de oxígeno como Alzheimer y Parkinson podrían mejorar al consumir los polifenoles del cacao debido a sus efectos antioxidantes (Montagna et al., 2019).

- **Cáncer:** Los estudios *in vitro* han demostrado que el cacao inhibe el crecimiento de células cancerosas mediante mecanismos anticancerígenos aún desconocidos. Estudios en ratones demostraron que las procianidinas del licor de cacao disminuyeron significativamente la incidencia y multiplicación de carcinomas de pulmón, adenomas tiroideos e inhibieron la tumorigénesis mamaria y pancreática. Además, las procianidinas presentan actividad inhibitoria sobre el factor de crecimiento endotelial vascular y angiogénesis (Montagna et al., 2019).
- **Microbiota intestinal:** La microbiota del intestino grueso metaboliza las procianidinas y polifenoles produciendo compuestos bioactivos como valerolactonas y varios ácidos fenólicos con potenciales propiedades antiinflamatorias. Se ha observado que la ingesta de cacao en cerdos está relacionada con la proliferación de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* del grupo *casei*. En humanos se ha demostrado que una ingesta de 494 mg de flavonoides de cacao diaria durante cuatro semanas indujo un crecimiento significativo del microbiota intestinal (Montagna et al., 2019).

Para obtener estos efectos positivos en la salud se requiere consumir chocolate negro amargo rico en polifenoles de manera prolongada en el tiempo, frecuentemente y en cantidades suficientes. Las investigaciones obtienen resultados medibles y significativos sobre la salud cuando se administran porciones ≥ 30 g de chocolate por día en un periodo superior a 4 semanas (García et al., 2018; Kim et al., 2016).

1.3. Actividad antioxidante

1.3.1. Radicales libres

El oxígeno es un componente esencial en el metabolismo de los organismos aerobios, a pesar de esto, de acuerdo a las diferentes reacciones que ocurren durante su reducción dentro de la célula, resultan en la formación de especies reactivas de oxígeno como subproducto nocivo, siendo en su mayoría radicales libres. Un radical libre es una molécula o un átomo que presenta un electrón no apareado, razón por la cual es sumamente reactivo (Crespo, 2018). Los más relevantes incluyen a los radicales superóxidos, peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos (Gutiérrez et al., 2014). La acumulación de especies reactivas provocado por un desequilibrio en los mecanismos antioxidantes endógenos, da paso a lo que se denomina estrés oxidativo. Las principales especies reactivas son radicales de oxígeno y nitrógeno, las más comunes son los radicales de anión superóxido, hidroxilo, alcoxilo, peroxilo y óxido nítrico. Otras especies reactivas de importancia biológica son el peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, ozono, peroxinitrito y oxígeno singlete (Halliwell, 2012). Estas especies reactivas desempeñan un papel vital en la progresión de aterosclerosis, daño

oxidativo al ADN, de carbohidratos, peroxidación de lípidos en membranas biológicas y proteínas, produciendo un deterioro estructural y funcional en la célula, activando la apoptosis, promoviendo el envejecimiento y a la eventual aparición de enfermedades no transmisibles (Aron y Kennedy, 2008; Cheng et al., 2017).

1.3.2. Ensayos espectrofotométricos

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante de una muestra permiten comprobar cómo la presencia de un antioxidante puede evitar el daño inducido a un sustrato por parte de un agente oxidante. Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante, entre los más utilizados se encuentran los métodos ABTS^{•+} y DPPH[•]. Son métodos espectrofotométricos económicos, simples y convenientes basados en la neutralización de los cromóforos estables radicales 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico-ácido (ABTS^{•+}) y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) (Mesa-Vanegas et al., 2015).

La desventaja de estos métodos es que no reflejan situaciones *in vivo*, pero proporcionan información importante sobre el potencial antioxidante intrínseco de una muestra en estudio, con una mínima interferencia ambiental (Mesa-Vanegas et al., 2015).

1.4. Inhibición enzimática

1.4.1. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

Los polifenoles del cacao han demostrado intervenir en la glucoregulación por lo que son de interés para la prevención y el control de la diabetes tipo 2 (Cao et al., 2019). En particular estos polifenoles tienen la capacidad de inhibir la enzima α -glucosidasa ralentizando la digestión de los carbohidratos, lo que reduce la absorción de glucosa y controla los niveles de glucemia postprandial. Esta enzima se encuentra presente ampliamente en el borde en cepillo de la mucosa del intestino delgado e hidroliza enlaces glucosídicos produciendo monosacáridos, oligosacáridos y glicosaminoglicanos permitiendo su absorción y el aumento de la glucemia postprandial (Morze et al., 2020; Yingying et al., 2022).

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de muestras

Las muestras de *Theobroma cacao* L clon CCN-51 fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología y Biodiversidad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Las muestras de cacao fresco, fermentado, seco y licor de cacao, son el material de trabajo del proyecto CEPRA XVI-2022 cacao CCN-51, en desarrollo.

- **Recolección:** Las mencionadas muestras se recolectaron como vainas maduras de cacao de la variedad CCN-51 libres de daños y enfermedades de tres fincas: finca Segarra (finca 1), finca de Petronio Sacoto (finca 2) y finca de Mónica Sacoto (finca 3); pertenecientes a la comunidad de Zhucay, provincia de Cañar, Ecuador. Las tres fincas en estudio se encuentran a una altitud entre 0 y 200 m.s.n.m.; con un clima tropical húmedo, precipitación pluvial de 1500-1750 mm, temperatura promedio de 25 °C con variaciones entre 18 °C y 36 °C y una humedad relativa entre el 70 % y el 90 %.
- **Cosecha:** Las mazorcas de cacao maduras de coloración rojo brillante fueron abiertas manualmente con un cuchillo de acero inoxidable y se extrajeron las semillas junto al mucilago.
- **Fermentación:** En un saco de yute se colocaron 50 kg de cacao fresco y se apilaron. Los sacos se voltearon cada 24 h, al tercer día la fermentación alcanzó 45 °C. El tiempo de fermentación de las muestras de las fincas 2 y 3 fue de 5 días y de 6 días para la finca 1. Cada muestra fue fermentada a temperatura ambiente en sus respectivas fincas, protegidas de la lluvia.
- **Secado:** Las muestras de las fincas 2 y 3 fueron secadas por el método de secado natural, colocando los granos de cacao sobre un piso de concreto y exponiéndolos al sol aproximadamente por 10 h por día por 7 días, hasta llegar a un contenido de humedad final del 7 %. Las muestras de la finca 1 fueron secadas en un secador de ladrillos con láminas de acero perforadas y aire desecante a 60 °C por 24 horas, obteniendo una humedad final del 7 %.
- **Tostado y descascarillado:** Las muestras de las tres fincas fueron tostadas bajo las mismas condiciones, en un tambor tostador de acero a una temperatura de 150 °C por 40 minutos, alcanzando una humedad final del 5 %, finalmente fueron descascarilladas con un ventilador de aire forzado.

- **Molido:** Las muestras de las tres fincas fueron molidas en un molino de granito-piedra por 1 h a 60 °C, obteniéndose licor de cacao que fue colocado en moldes de teflón y una vez solidificados fueron colocados en bolsas plásticas para su posterior procesamiento.
- **Liofilización:** Las muestras de granos de cacao fresco, fermentado y seco fueron liofilizadas en un liofilizador serie KD-10N, ZZKD de fabricación China, durante 120 h a -65 °C y 100 Pa. Todas las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis.

2.2. Preparación de extractos enriquecidos en polifenoles

Los extractos se obtuvieron de acuerdo al protocolo desarrollado por Li et al. (1996). El licor de cacao se fue congelado con nitrógeno líquido y triturado en un mortero, las muestras liofilizadas no necesitaron ser congeladas. Posterior mente, todas las muestras fueron suspendidas en 5 a 10 volúmenes de acetona al 95 % en agua, la mezcla fue agitada 30 segundos en un vórtex, sonicada 10 minutos y centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos para conseguir un pellet. El sobrenadante fue recuperado y la extracción con acetona se repitió. La acetona fue removida del sobrenadante mediante destilación a presión reducida. La clorofila y compuestos apolares fueron removidos añadiendo 1 mL de cloroformo en el extracto, se agito en un vórtex por 1 minuto y centrifugada a 10000 rpm por 2 minutos, se desechó la fase orgánica y se repitió la operación dos veces. Las muestras se evaporaron a sequedad bajo presión reducida. El residuo seco fue disuelto en 1 mL de metanol y centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos, el extracto metanólico fue recuperado y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos

2.3.1. Análisis del contenido de polifenoles totales

El ensayo se fundamenta en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu con compuestos fenólicos en un medio alcalino, formándose un cromóforo azul con una absorbancia máxima en 750 nm (Munteanu & Apetrei, 2021).

Posee varias ventajas como su sencillez, robustez y reproducibilidad. Entre los inconvenientes incluye su sensibilidad al pH, temperatura y tiempo de reacción, por ello se debe de definir adecuadamente las condiciones de reacción. Además, los reductores no fenólicos crean interferencias ocasionando una sobreestimación del TPC, los contaminantes abarcan azúcares reductores y aminoácidos. Hay que tener en cuenta que la reacción se

realiza en un medio acuoso lo que limita su aplicación para fenoles lipofílicos (Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021).

Se utilizó la metodología reportada por Singleton et al. (1999). El método fue adaptado al ensayo en microplaca: En un tubo eppendorf de 1,5 mL se colocaron 25 μ L del extracto, 25 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó en reposo por 5 minutos para luego añadir 500 μ L de Na_2CO_3 (75 g/L) y 350 μ L de agua destilada. Se incubó por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se dispensó alícuotas de 300 μ L de la mezcla en una microplaca de 96 pocillos. Luego, se midió la absorbancia a 750 nm empleando un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Estados Unidos) adaptado a un software de análisis de datos Gen 5. Se empleó ácido gálico (20 mg/mL) como patrón para la realización de una curva de calibración dentro del rango de 26-414 ppm, **(Anexo F)**. El contenido de polifenoles totales fue expresado en miligramo equivalente de ácido gálico por 100 gramos de peso seco (mg EAG/100 g p.s.) (Singleton et al., 1999).

2.3.2. Análisis del contenido de flavonoides totales

Se empleó el método colorimétrico de cloruro de aluminio. El ensayo de cloruro de aluminio es un método espectrofotométrico donde el catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides produciendo la intensificación de la absorción, con una absorbancia máxima en 415 nm. El método permite determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de sustancias fenólicas en especial de ácidos fenólicos (Pękal y Pyrzynska, 2014).

Se utilizó la metodología reportada por Cazar et al. (2023). En una placa de microtitulación de 96 pocillos se realizó el ensayo por triplicado para el cual se mezcló una alícuota de 100 μ L de extracto y 100 μ L de solución de AlCl_3 (2 % en metanol) y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, se midieron las absorbancias a 415 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Estados Unidos). Se empleó quercetina como estándar para la realización de la curva de calibración dentro del rango de 500-1 μ g/mL, **(Anexo G)**. Los resultados fueron expresados en miligramo equivalente de quercetina por 100 gramos de peso seco (mg EQ/100 g p.s.).

2.4. Determinación de la capacidad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de extractos orgánicos de *Theobroma cacao* L clon CCN-51, se realizaron ensayos espectrofotométricos de captura de radicales libres, todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.4.1. Ensayo ABTS^{•+}

El método ABTS^{•+} se basa en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno y en la reacción por transferencia de electrones, donde un antioxidante dona un átomo de hidrógeno o un electrón al catión radical estable ABTS^{•+} neutralizándolo y causando la disminución del color azul-verde, esta decoloración es medida por espectrofotometría a una máxima absorción de 734 nm. Para generar el catión radical estable ABTS^{•+} se emplea el ácido ABTS y persulfato de potasio como oxidante. El método permite determinar la capacidad antioxidante total de compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos en un amplio rango de pH (Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021).

Se utilizó la metodología descrita por Mingle y Newsome (2020). Se preparó el reactivo de trabajo haciendo reaccionar en partes iguales una solución del radical libre estable ABTS^{•+} 0,7 mM con una solución de persulfato de potasio 2,45 mM. Se realizó el análisis por triplicado, colocando alícuotas de 10 µl del extracto en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se diluyeron con 50 µl de tampón PBS pH 7, seguido de la adición de 100 µl del reactivo de trabajo. La mezcla se incubó durante 15 minutos en un área oscura. Finalmente, se midieron las absorbancias a 734 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Estados Unidos). La capacidad antioxidante se calculó a partir de una curva de calibración usando ácido ascórbico como estándar dentro del rango de 0,184-0,00035 mg/mL, (**Anexo H**). Los resultados se expresaron como miligramo de ácido ascórbico por gramo de peso seco.

2.4.2. Ensayo DPPH[•]

El método DPPH[•] se basa en la capacidad de los antioxidantes de donar un átomo de hidrógeno al radical DPPH[•] neutralizándolo, cuya reacción se acompaña de una decoloración del color violeta que es medido mediante espectrofotometría a 517 nm, permitiendo determinar la capacidad antioxidante total. El radical DPPH[•] es soluble en disolventes orgánicos y metanol, pero no en agua, lo que permite aplicar el método únicamente en sistemas hidrofóbicos (Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021).

Se utilizó el procedimiento propuesto por Prieto (2012). En una placa de microtitulación de 96 pocillos se colocaron 100 µL de metanol, 100 µL de los extractos de cacao y 100 µL de solución de DPPH[•] (0,2 mM en metanol). Se dejó reaccionar en la oscuridad por 30 minutos. Los pocillos de muestra de control contenían una solución de DPPH[•] 0,2 mM en Metanol. Se midieron las absorbancias a 517 nm mediante un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como % de eliminación de DPPH[•] (AE) según lo explicado por Saeed et al. (2012).

$$AE(\%) = \frac{(absorbancia\ del\ control - absorbancia\ de\ la\ muestra)}{absorbancia\ del\ control} \times 100$$

2.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de enzimas involucradas en el desarrollo de ENT

2.5.1. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

El ensayo espectrofotométrico *in vitro* de inhibición de la α -glucosidasa se realizó usando una microplaca de 96 pocillos de acuerdo a la metodología reportada por Abbas et al (2016). Se preparó una solución de enzima α -glucosidasa (0,01 mg/mL) en tampón fosfato 50 mM (pH 6,8). En una placa de microtitulación de 96 pocillos se mezclaron 10 μ L de extracto, 70 μ L de tampón fosfato (pH 6,8) y 20 μ L de solución de enzima α -glucosidasa. Los pocillos de muestra de control contenían 80 μ L de tampón fosfato (pH 6,8) y 20 μ L de solución de enzima α -glucosidasa. La mezcla de reacción se pre-incubó a 37 °C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 20 μ L de p-nitrofenil α -d-glucopiranosido (PNPG) 5 mM y se incubó durante 15 min. Luego de la incubación, se agregaron 80 μ L de Na_2CO_3 (0,2 M). La hidrólisis enzimática del sustrato fue medida mediante un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Estados Unidos) a una absorbancia de 405 nm. La actividad de inhibición de la α -glucosidasa se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Inhibición (\%) = \frac{(absorbancia\ del\ control - absorbancia\ de\ la\ muestra)}{absorbancia\ del\ control} \times 100$$

2.6. Análisis estadístico

Los bioensayos fueron realizados por triplicado para cada una de las muestras analizada. Se evaluaron diferencias significativas entre promedios mediante Análisis de Varianza a un factor, con un nivel de significancia del 0,05 %, para analizar las diferencias entre los grupos. Adicionalmente se realizó un post hoc de Tukey para comparación de medias. Las pruebas se realizaron con el paquete estadístico SPSS Ver. 28.

3. Resultados y discusión

3.1. Determinación de polifenoles totales

La **Tabla 1** y **Figura 6** presentan los resultados en el contenido fenólico total (TPC), a partir de muestras de cacao en sus diferentes etapas post-cosecha: grano fresco, grano fermentado, grano seco y licor de cacao, de tres diferentes fincas pertenecientes a la parroquia de Zhucay.

Tabla 1. Contenido de fenoles totales durante el proceso de post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador), expresados en miligramos de equivalente de ácido gálico por 100 gramos de peso seco (mg EAG/100 g p.s.).

Finca	Proceso post-cosecha de cacao CCN-51				Valor p
	Grano fresco	Grano fermentado	Grano seco	Licor de cacao	
1	2321,9 ± 5,7 ^{b,c,d}	1370 ± 12,6 ^{a,c,d}	881,1 ± 4,5 ^{a,b,d}	434,9 ± 13 ^{a,b,c}	<0,001
2	2208,9 ± 10,7 ^{b,c,d}	1101,5 ± 11,1 ^{a,c,d}	351,5 ± 12,7 ^{a,b,d}	260,7 ± 9,2 ^{a,b,c}	<0,001
3	2257 ± 12,9 ^{b,c,d}	1286,7 ± 18 ^{a,c,d}	421,9 ± 2,6 ^{a,b,d}	321,9 ± 8,1 ^{a,b,c}	<0,001

* Para la misma finca letras diferentes en una fila indica diferencias significativas entre las medias, de acuerdo al análisis ANOVA y prueba de Tukey ($p < 0,001$)

Es sabido que el cacao es fuente de compuestos polifenólicos, especialmente de polifenoles de los grupos catequina, procianidina, antocianinas y glúcidos de flavanoles (Borja et al., 2022). También se ha observado que el proceso post-cosecha para la obtención de derivados de cacao influencia el TPC, especialmente en las fases de fermentación, secado y tostado (Vázquez et al., 2016). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo descrito en literatura, evidenciándose una disminución del TPC durante los procesos de fermentado, secado y obtención de licor de cacao.

El grano fresco de la finca 1 obtuvo el mayor TPC de 2321,9 ± 5,7 mg EAG/100 g p.s. y al final del proceso post-cosecha el licor de cacao con mayor TPC fue de la finca 1 con 434,8 ± 13 mg EAG/100 g p.s. Es así que en la finca 1 se observó una disminución del 81,3 % del TPC; sin embargo, la finca 2 es la que obtuvo una mayor reducción del TPC con un 88,2 %.

Los resultados obtenidos del TPC en granos de cacao clonal CCN-51 son superiores a lo reportado por Chumaña (2022), en cuyo trabajo se presentó un TPC de 1180,5 mg EAG/100 g. No obstante, el contenido de TPC es inferior a lo reportado en recientes estudios. Borja et al, (2022), presentó un TPC de 9541 ± 2,5 mg EAG/100 g, mientras que, en el estudio de

Fernández, (2016), se presentan valores de TPC de 8400 ± 9 mg EAG/100 g. Estas diferencias se encuentran relacionadas a la localidad de cultivo, genotipo, factores del suelo, época de cosecha, condiciones climáticas y los manejos post-cosecha (Borja et al., 2022). Además, la cantidad de polifenoles puede ser afectada por el tipo de extracción, tiempo, solvente y el tamaño de partícula del material empleado (Urbańska & Kowalska, 2019).

La fermentación tiene un impacto notable en TPC, así lo muestran los resultados obtenidos. En la finca 1 esta etapa se realiza en 6 días, lo cual genera un TPC de $1370 \pm 12,6$ mg EAG/100 g, lo que corresponde a una disminución del 41 % del TPC en relación al grano fresco. Las fincas 2 y 3 realizan esta operación en 5 días, sin embargo, son las que tienen una mayor pérdida del TPC un 50,3 % y 43 %, respectivamente.

Estos hallazgos no concuerdan con lo reportado en literatura, donde se establece que un mayor tiempo de fermentación influye en una mayor degradación de polifenoles. Melo et al, (2021) reportaron una disminución del contenido de polifenoles de 54,7 % al quinto día de fermentación y de 60 % en el sexto día. Los resultados obtenidos podrían estar relacionado con el método artesanal de fermentación llevado a cabo por cada finca, ya que las fuentes bibliográficas revisadas desarrollan procesos de fermentación de cacao en laboratorio, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

El secado es un paso fundamental en el procesamiento del cacao en el cual se reduce el contenido de humedad que oscila entre 60 %-50 % obteniendo una humedad del 7 % con el fin de garantizar su correcto almacenamiento, impedir la proliferación de hongos, inhibir la generación de sabores desagradables y garantizar su calidad (Vázquez et al., 2016). Sin embargo, es una etapa en la que se disminuye significativamente el TPC relacionado principalmente al método de secado empleado (Vázquez et al., 2016). En el actual estudio fueron empleados dos métodos de secado, la finca 1 utilizó un secador de ladrillos con láminas de acero perforadas y aire desecante a 60 °C, requiriéndose un día para alcanzar una humedad del 7 %; mientras que, las fincas 2 y 3 secaron los granos de cacao exponiéndolos directamente al sol requiriéndose 7 días para alcanzar una humedad del 7 %. Es así que, la finca 1 contiene el mayor TPC un $881,1 \pm 4,5$ mg EAG/100 g p.s. al final del secado perdiendo un 35.7 % del TPC inicial siendo el más bajo, mientras que en la finca 2 contiene un TPC de $351,5 \pm 12,7$ mg EAG/100 g p.s. observándose una pérdida del 68.1 % la cual es la mayor de todas. Los resultados obtenidos difieren en el porcentaje de pérdida del TPC obtenido por Barrientos et al, (2019), que al emplear un secador reportó una pérdida del 28,4 % de TPC y Chávez en el 2020, mediante el secado directamente al sol reportó una pérdida del 36,7 %. Estas diferencias estarían relacionadas principalmente con el tiempo que

se requirió para el secado, especialmente en lo reportado por Chávez, ya que requirió de 4,5 días para alcanzar un 7 % de humedad. La prolongación del tiempo de secado permite la degradación enzimática de polifenoles mediado por las polifenol oxidasas (Vázquez et al., 2016).

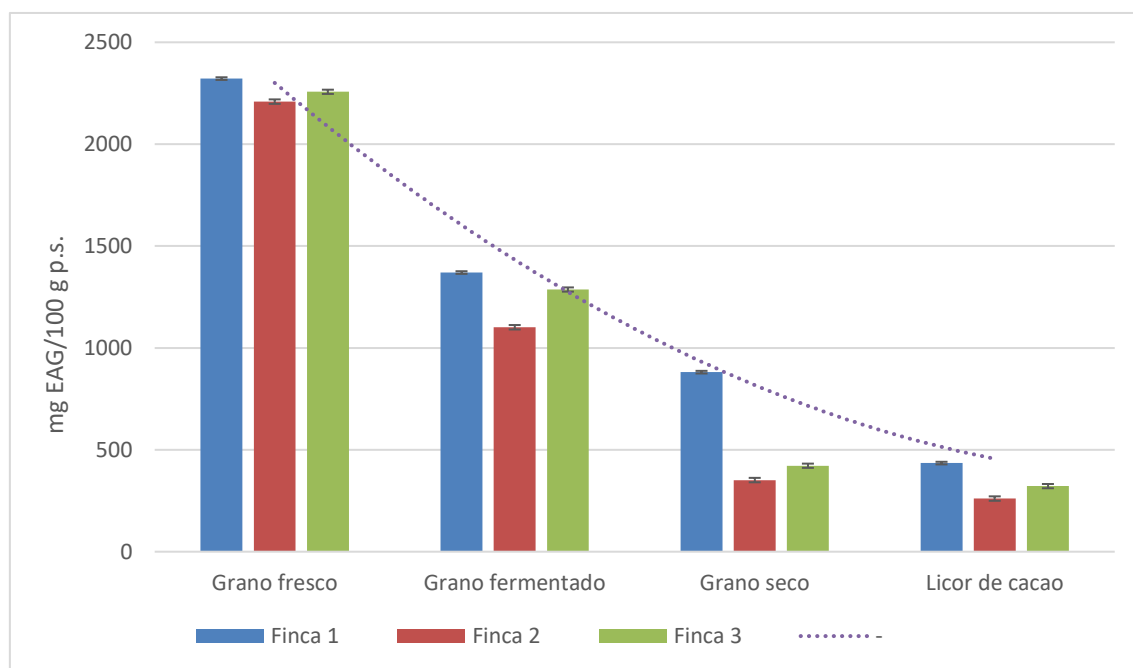


Figura 6. Contenido fenólico total durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.

3.2. Determinación de flavonoides totales

La **Tabla 2** y **Figura 7** presentan los resultados en el contenido de flavonoides totales, obtenidos mediante el método colorimétrico de cloruro de aluminio, a partir de muestras de cacao en sus diferentes etapas postcosecha: grano fresco, grano fermentado, grano seco y licor de cacao, de las tres fincas cacaoteras incluidas en el estudio.

Tabla 2. Contenido total de flavonoides durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador), expresados en miligramos de equivalente de quercetina por 100 gramos de peso seco (mg EQ/100 g p.s.).

Finca	Proceso post-cosecha de cacao CCN-51				Valor p
	Grano fresco	Grano fermentado	Grano seco	Licor de cacao	
1	33,9 ± 0,3 ^{b,c,d}	29,9 ± 0,3 ^{a,c,d}	25,2 ± 1,1 ^{a,b,d}	10,1 ± 1,4 ^{b,c,d}	<0,001
2	39,1 ± 1,3 ^{b,c,d}	23,1 ± 0,5 ^{a,c,d}	21,7 ± 0,8 ^{a,b,d}	11,3 ± 0,3 ^{b,c,d}	<0,001
3	41 ± 2,4 ^{c,d}	37,6 ± 1,7 ^{c,d}	20,9 ± 0,9 ^{a,b,d}	10 ± 0,9 ^{b,c,d}	<0,001

* Para la misma finca letras diferentes en una fila indica diferencias significativas entre las medias, de acuerdo al análisis ANOVA y prueba de Tukey (p<0,001)

El cacao es rico en flavanoles o flavan-3-oles (37 %), antocianinas (4 %) y proantocianidinas (58 %); en particular es abundante en epicatequina y catequina (Fraga et al., 2019). Sin embargo, el contenido de flavonoides es variable y depende principalmente de la variedad de cacao, región productora y condiciones de cultivo (Carrillo et al., 2014).

El grano fresco de la finca 3 obtuvo el mayor contenido de flavonoides de 41 ± 2,4 mg EQ/100 g p.s. y al final del proceso post-cosecha el extracto de licor de cacao con el menor contenido de flavonoides fue la muestra procedente de la finca 3; es decir, a lo largo del procesamiento del cacao la finca 3 perdió el 75,5 % del contenido de flavonoides, siendo en la que se observó la mayor disminución. Para las fincas 1 y 2 al final del procesamiento se observó una disminución del contenido de flavonoides del 70,1 % y 71,1 % respectivamente.

El procesamiento del cacao tiene repercusión en el contenido de flavonoides totales observándose diferencias significativas entre cada proceso, de esta manera la fermentación, secado y tostado disminuyen considerablemente la concentración de flavonoides (Giacometti et al., 2015). Esta disminución durante el procesamiento es mucho más elevada que lo reportado por Cuzcano (2020), que obtiene una pérdida total de flavonoides entre el 14 % y 48 % al final del procesamiento de granos de cacao clones ICS-1 y ICS-95.

Durante la fermentación del cacao se determinó una disminución significativa en el contenido de flavonoides en las fincas 1 y 2 del 11,8 % y del 41 % respectivamente. En el estudio realizado por Goude et al en (2019) se reportó la disminución del 49 % durante la etapa de fermentación. Esta reducción está relacionada con la pérdida de (-)- epicatequina la cual es afectada directamente por polifenoloxidasas disminuyendo el contenido inicial en un 90 %,

también se degradan antocianinas en un 93 % al fermentar los granos de cacao por 4 días (Urbańska et al., 2019).

Durante el proceso de secado se observó la disminución significativa del contenido de flavonoides de las fincas 1 y 3 del 15 % y 44,3 % respectivamente. Aquí se evidencia el efecto del procesamiento térmico y la generación de otros procesos bioquímicos como pardeamiento enzimático y la acción de polifenoloxidasas que promueven la degradación de flavonoides a quinonas y polímeros marrones (Urbańska et al., 2019).

En la etapa de tostado existe una drástica disminución en el contenido de flavonoides en las fincas 1, 2 y 3 del 59,8 %, 47,9 % y 52 % respectivamente. Las disminuciones observadas son similares a lo reportado por Cuzcano en (2020), que en la etapa de tostado obtuvo una disminución entre el 52 % al 54 %. Esta disminución marcada se relaciona con las elevadas temperaturas que se someten los granos de cacao durante el tostado, al ser los flavonoides termolábiles su concentración disminuye al finalizar este proceso; adicionalmente, altas temperaturas inducen la epimerización de (+)-catequina a (+)-epicatequina y de (-)-epicatequina a (-)-catequina, también las procianidinas sufren epimerización (Urbańska et al., 2019).

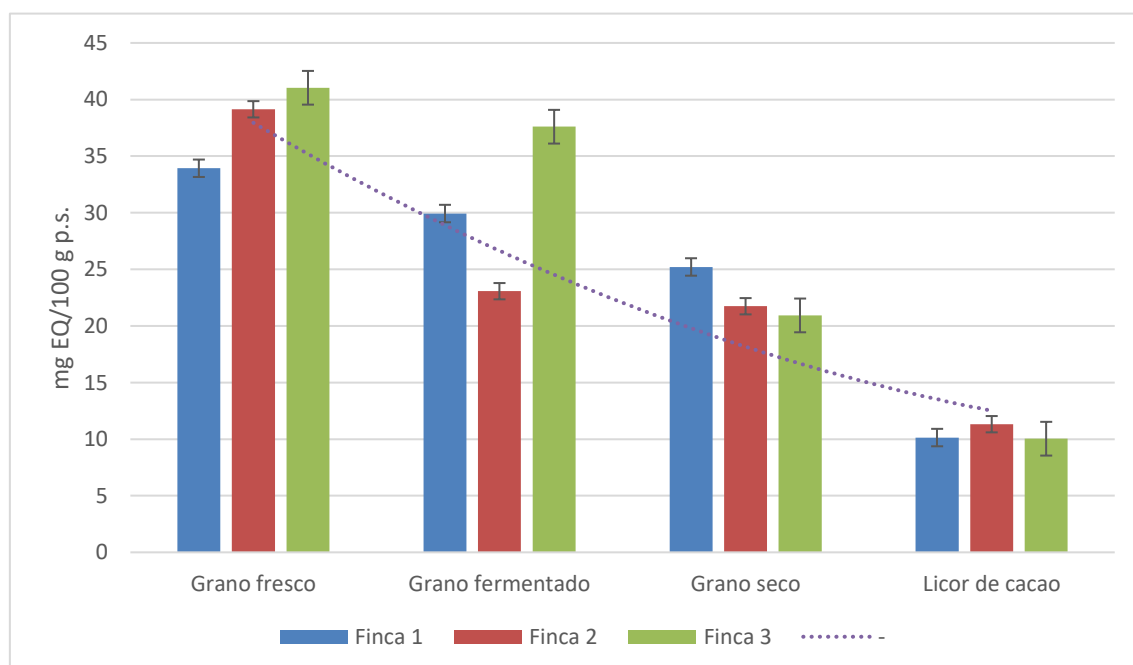


Figura 7. Contenido total de flavonoides durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.

3.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La **Tabla 3** presenta los resultados de la capacidad antioxidante obtenidos mediante el ensayo ABTS^{•+} y DPPH[•], a partir de muestras de cacao en sus diferentes etapas de post-cosecha: grano fresco, grano fermentado, grano seco y licor de cacao, en las fincas incluidas en el estudio.

Tabla 3. Determinación de la capacidad antioxidante mediante la actividad de eliminación de radicales catiónicos ABTS^{•+} y DPPH[•], durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador). Valores de ABTS^{•+} expresados en miligramos de ácido ascórbico por gramo de peso seco. Valores de DPPH[•] expresados como porcentaje de eliminación.

	Finca	Proceso post-cosecha de cacao CCN-51				Valor p
		Grano fresco	Grano fermentado	Grano seco	Licor de cacao	
ABTS ^{•+}	1	372,4 ± 0,9 ^{c,d}	372,3 ± 0,4 ^{c,d}	301,8 ± 1,7 ^{a,b}	298,7 ± 4,2 ^{a,b}	<0,001
	2	372 ± 0,6 ^{b,c,d}	329,8 ± 1,3 ^{a,c,d}	300,3 ± 1,5 ^{a,b,d}	274,3 ± 3,6 ^{b,c,d}	<0,001
	3	332,5 ± 0,6 ^{b,c,d}	315,1 ± 2,3 ^{a,c,d}	292,1 ± 2,4 ^{a,b,d}	267,6 ± 3 ^{b,c,d}	<0,001
DPPH [•]	1	83,2 ± 1,3 ^d	81,6 ± 1,8 ^d	78,3 ± 1,5 ^d	54,5 ± 2,1 ^{a,b,c}	<0,001
	2	82,6 ± 1,2 ^d	79,4 ± 0,7 ^d	75,6 ± 2,4 ^d	69,1 ± 3,4 ^{a,b,c}	<0,001
	3	81,5 ± 0,8 ^d	80,6 ± 0,8 ^d	77,6 ± 1,6 ^d	67,9 ± 2,8 ^{a,b,c}	<0,001

* Para la misma finca letras diferentes en una fila indica diferencias significativas entre las medias, de acuerdo al análisis ANOVA y prueba de Tukey (p<0,001)

El contenido de polifenoles totales se relaciona directamente con la actividad antioxidante (Cheng et al., 2017). De esta manera, los polifenoles neutralizan los radicales libres un subproductito del metabolismo oxidativo, evitando el estrés oxidativo y el consiguiente daño a biomoléculas de importancia como ADN, lípidos y proteínas (Racine et al., 2019). Esta actividad antioxidante previene, mitiga y frena el desarrollo de enfermedades no transmisibles. Los polifenoles y flavonoides del cacao han demostrado efectos beneficiosos en enfermedades tales como hipertensión, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares (Ried et al., 2017).

La actividad antioxidante mediante el método ABTS^{•+} permitió determinar que el grano fresco de la finca 1 posee una mayor actividad de 372,4 ± 0,9 mg de ácido ascórbico/g p.s. seguido por el grano fresco de la finca 2 la cual obtuvo un 372 ± 0,6 mg de ácido ascórbico/g p.s. Al final del procesamiento del cacao la finca con una mayor pérdida en la actividad antioxidante

fue la segunda con el 26 % y la que menos perdió esta actividad fue la finca 3 con el 19,8 %. Los resultados obtenidos indican que los procesos post-cosecha de fermentación, secado y tostado inciden en la actividad antioxidante. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Pallares et al (2016), quienes estudiaron el efecto del fermentado y secado en la actividad antioxidante de cacao CCN-51.

En la etapa de fermentación se observaron disminuciones en la actividad antioxidante en los dos métodos ABTS^{•+} y DPPH[•], la mayor pérdida de actividad antioxidante durante esta etapa fue en la finca 2 con una reducción del 11 % determinado mediante ABTS^{•+}. Pallares et al en (2016), observaron que la fermentación de granos de cacao CCN-51 tuvo un gran impacto en la capacidad antioxidante con una disminución del 58,3 %, mucho mayor a lo observado en esta investigación; por otro lado, Zapata et al, en (2013) registro un pequeño incremento en la actividad antioxidante de cacao CCN-51 del 0,9 % determinado mediante DPPH[•]. Estas diferencias estarían relacionadas con las condiciones de fermentación y diferencias en las metodologías de trabajo empleadas.

Debido que la actividad antioxidante está relacionado al contenido fenólico total, en la etapa de tostado cuando existe una mayor disminución de polifenoles también se reduce considerablemente la actividad antioxidante medida tanto por ABTS^{•+} y DPPH[•]. Esto concuerda con lo observado por Oliviero et al., (2009) y Oracz y Nebesny (2016), quienes obtuvieron disminuciones notables en la actividad antioxidante al finalizar la etapa de tostado. Sin embargo, Urbańska et al., (2019), señala que las propiedades antioxidantes dependen de la degradación térmica de polifenoles, pero también en la adición de antioxidantes mediante la reacción de Maillard, en especial cuando el tostado se realiza a una baja temperatura de 110 y 120 °C.

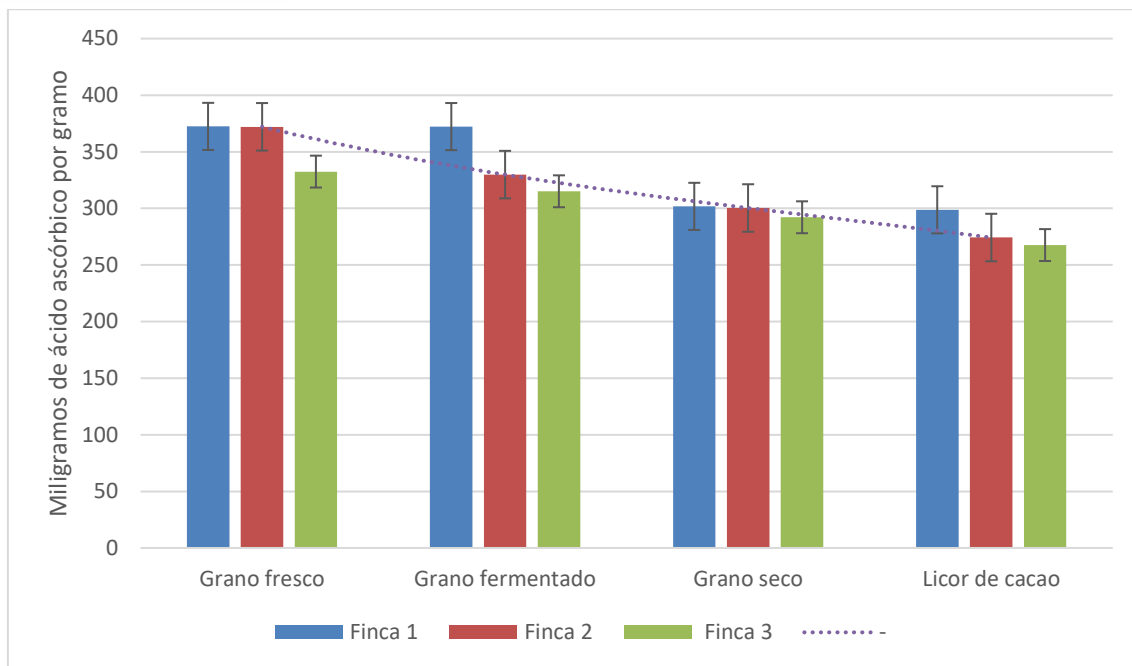


Figura 8. Actividad de eliminación de radicales catiónicos ABTS^{•+} durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.

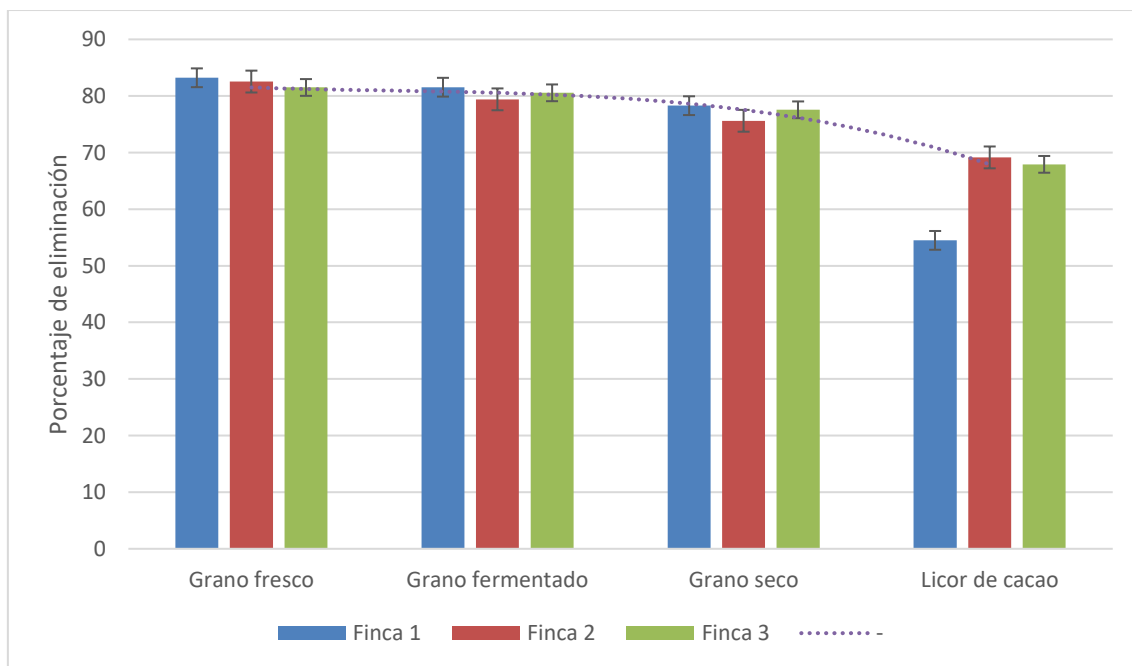


Figura 9. Actividad de eliminación de radicales DPPH[•] durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.

3.4. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa

La **Tabla 4** y **Figura 10** presentan los resultados de la capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa, a partir de muestras de cacao en sus diferentes etapas postcosecha: grano fresco, grano fermentado, grano seco y licor de cacao, de tres diferentes fincas pertenecientes a la parroquia de Zhucay.

Tabla 4. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51 en Zhucay (Cañar, Ecuador), expresados como porcentaje de inhibición.

Finca	Proceso post-cosecha de cacao CCN-51				Valor p
	Grano fresco	Grano fermentado	Grano seco	Licor de cacao	
1	57,2 \pm 0,7 ^{b,c,d}	49,1 \pm 0,8 ^{a,c,d}	33,8 \pm 1,3 ^{a,b,d}	35,1 \pm 0,9 ^{b,c,d}	<0,001
2	54,6 \pm 1,1 ^{b,c,d}	50,4 \pm 0,7 ^{a,c,d}	45,5 \pm 0,7 ^{a,b,d}	36,7 \pm 0,6 ^{b,c,d}	<0,001
3	47,6 \pm 0,4 ^{b,c,d}	44,5 \pm 0,9 ^{a,c,d}	35,2 \pm 0,5 ^{a,b,d}	43,5 \pm 1,3 ^{b,c,d}	<0,001

* Para la misma finca letras diferentes en una fila indica diferencias significativas entre las medias, de acuerdo al análisis ANOVA y prueba de Tukey ($p < 0,001$)

Los polifenoles poseen la capacidad de unirse e inhibir la α -glucosidasa (Morze et al., 2020). Dai et al (2019), mediante análisis espectroscópico y simulación de acoplamiento molecular observaron que las procianidinas tipo B se unen al sitio activo de α -glucosidasa mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas ocasionado la inhibición enzimática. En el estudio llevado a cabo por Lee y Williamson en 2010 observaron la disminución de la hidrólisis de sacarosa en células Caco-2 al adicionar extractos de cacao que contenían (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B2, hallazgos que demuestran que polifenoles y flavonoides inhiben la hidrólisis de sacarosa por la enzima α -glucosidasa. De esta manera, se retrasa la descomposición de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos en el intestino delgado, disminuyendo y ralentizando la absorción de glucosa y la consiguiente hiperglucemia postprandial.

El grano fresco de la finca 1 obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del 57,2 \pm 0,7 % y al final del proceso postcosecha el licor de cacao con mayor porcentaje de inhibición fue de la finca 3 del 43,5 \pm 1,3 %. Durante el proceso postcosecha se observó una disminución del porcentaje de inhibición del 38,7 %, 32,8 % y 8,6 % de las fincas 1, 2 y 3 respectivamente. Los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de extractos de granos de cacao son similares a los encontrados por Bellesia & Tagliazucch (2014), que reportaron una actividad inhibitoria entre el 47 y 56 %. En el estudio realizado por Racine et al (2019), se comparó la

capacidad inhibitoria de los extractos de cacao frente al medicamento acarbosa, reportándose una actividad promisorio de los extractos de cacao, en comparación con acarbosa.

Durante la etapa de tostado y molienda se observó que la actividad inhibitoria no disminuyó considerablemente e incluso en la finca 3 se apreció el aumento del 23,5 % con respecto al grano seco (Figura 10). Estos hallazgos concuerdan con lo expuestos por Ryan et al, en 2016 quienes reportaron que existieron diferencias significativas en la capacidad inhibitoria de la α -glucosidasa de extractos de cacao fermentado y tostado, resaltando que el tostado de granos de cacao mejoró la actividad inhibitoria, por lo que sugieren que el procesamiento del cacao produce cambios en la composición que influye positivamente la inhibición de enzimas digestivas como α -glucosidasa. Racine et al en (2019), también llegan a la conclusión que la fermentación y tostado pueden mejorar la actividad inhibitoria, en especial cuando la fermentación se realiza a temperaturas $< 46\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el tostado a $< 120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

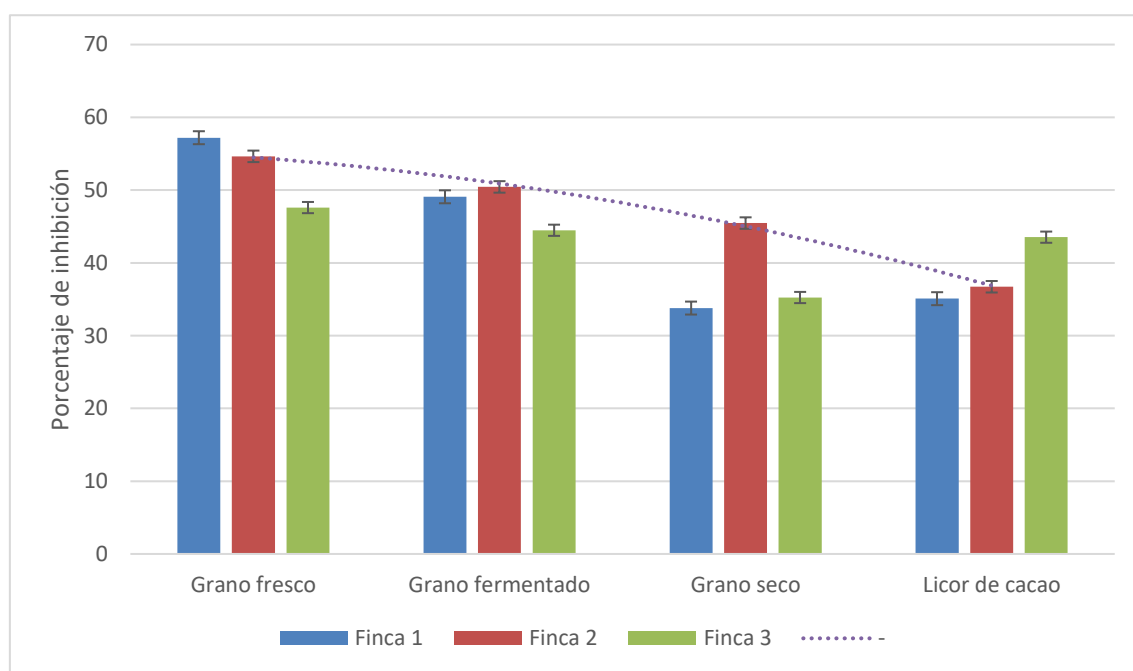


Figura 10. Capacidad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa durante el proceso post-cosecha de cacao clonal CCN-51.

La actividad inhibitoria observada no se encuentra necesariamente correlacionada con el contenido de polifenoles y flavonoides, en especial en la etapa de tostado donde la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa se mantiene e incluso aumenta como es el caso de la finca 3. Sin embargo, el contenido de polifenoles y flavonoides durante la etapa de tostado disminuye significativamente en las tres fincas. Estos hallazgos son similares a los reportados por Ryan

en (2016), donde encontró pocas correlaciones entre el contenido de polifenoles y la bioactividad frente a α -glucosidasa, destacando que una concentración más alta de polifenoles y flavonoides no necesariamente sugiere una mayor inhibición enzimática. Además, Racine et al en (2019), observaron que la reducción del contenido de polifenoles y flavonoides por procesos de fermentación y tostado no significó necesariamente la reducción de la actividad inhibitoria; además, sugieren que la polimerización de flavanol durante la etapa de tostado es un mejor marcado de inhibición de la α -glucosidasa.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

En la presente investigación se determinó que los extractos orgánicos de cacao CCN-51, obtenidos en las diferentes etapas de procesamiento presentan actividad antioxidante y capacidad de inhibir la enzima α -glucosidasa; por ello el cacao CCN-51 y derivados, obtenidos en el austro ecuatoriano, deben considerarse como una fuente promisorio de compuestos bioactivos como los polifenoles.

El trabajo experimental incluyó la aplicación de métodos espectrofotométricos para determinar el contenido de polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y capacidad inhibitoria de α -glucosidasa de extractos orgánicos de cacao CCN-51 cultivado en la comunidad de Zhucay, Cañar.

El contenido de polifenoles, flavonoides, actividad antioxidante y capacidad inhibitoria de α -glucosidasa es afectado por los procesos postcosecha de manera significativa, observándose una disminución paulatina durante las etapas de fermentado, secado, tostado y molido.

Los extractos orgánicos de cacao CCN-51 presentan actividad inhibitoria de α -glucosidasa, esta actividad es afectada por las etapas de procesamiento del cacao, a excepción en la etapa de tostado en la que se observó un aumento de la capacidad inhibitoria de la finca 3. Este hecho puede deberse a fenómenos de polimerización de flavonoides, los cuales ocurren en dependencia de las condiciones de tostado y secado del grano de cacao.

4.2. Recomendaciones

Se recomienda optimizar los procesos de elaboración de chocolate artesanal de productores de la asociación Zhucay con el fin de estandarizar su producto final y garantizar una concentración óptima de compuestos fenólicos, que beneficie la salud de sus consumidores.

Es necesario evaluar la actividad antioxidante del cacao producido por la asociación Zhucay mediante otros métodos espectrofotométricos como la capacidad de absorción de radicales de Oxígeno (ORAC) y/o el poder antioxidante reductor férrico (FRAP). De este modo se comparará la estimación de actividad antioxidante obtenida por captura de radicales libres con ensayos redox, que involucran transferencia de electrones.

Investigaciones a futuro deben evaluar el efecto del consumo de cacao CCN-51 y derivados en personas sanas, sobre los niveles de glucemia postprandial, correlacionado con el potencial inhibitorio de enzimas digestivas como α -glucosidasa.

Referencias

- Abad, A., Acuña, C., & Naranjo, E. (2020). El cacao en la Costa ecuatoriana: Estudio de su dimensión cultural y económica. *Estudio Gestión. Int. rev. Adm*, 7: 59–83. <https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>
- Abbas, G., Al-Harrasi, A. S., & Hussain, H. (2016). α -glucosidase enzyme inhibitors from natural products. *Discovery and Development of Antidiabetic Agents from Natural Products*, 251-269
- Afoakwa, E. (2010). Chocolate Science and Technology. In *Science and Technology of Enrobed and Filled Chocolate, Confectionery and Bakery Products*. Wiley-Blackwell.
- Aron, P., & Kennedy, J. (2008). Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular nutrition & food research*, 52(1), 79–104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Arteaga, Y. (2013). *Estudio del desperdicio del mucílago de cacao en el cantón Naranjal (Provincia del Guayas)*. ECA Sinergia Vol. 4. Universidad Técnica de Manabí. Retrieved from <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/ECASinergia/article/view/149>
- Barrientos, L. D. P., Oquendo, J. D. T., Garzón, M. A. G., & Álvarez, O. L. M. (2019). Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food research international*, 115, 259-267. 10.1016/j.foodres.2018.08.084
- Bellesia, A., & Tagliazucchi, D. (2014). Cocoa brew inhibits *in vitro* α -glucosidase activity: The role of polyphenols and high molecular weight compounds. *Food Research International*, 63, 439-445 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.047>.
- Belščak, A., Draženka, K., Horžić, D., Kovačević, K., & Karlović, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42, 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.018>
- Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Baines, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, 10(11), 2595-2610. <https://doi.org/10.3390/foods10112595>
- Borja Fajardo, J. G., Horta Tellez, H. B., Peñaloza Atuesta, G. C., Sandoval Aldana, A. P., & Mendez Arteaga, J. J. (2022). Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxanthine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima, Colombia. *Heliyon*, 8(5), e09402. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09402>
- Cao, H., Ou, J., Chen, L., Zhang, Y., Szkudelski, T., Delmas, D., Daglia, M., & Xiao, J. (2019). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human Study and Clinical Trial. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(20), 3371–3379. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1492900>
- Carrillo, L., Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenols, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in

- Colombia. *Food Research International*, 60, 273 – 280.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Reseña bibliográfica FLAVONOIDES: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
- Cazar, M. E., Abad, D. H., Idrovo, A. M., & Barrera, D. A. (2023). Assessment of antioxidant activities of *Epidendrum secundum* Jacq, a terrestrial orchid from southern Ecuadorian highlands. *South African Journal of Botany*, 154, 380-386.
- Centro de Comercio Internacional. (1991). *Cacao - Guía del Comerciante*. Ginebra: UNCTAD/GATT.
- Chávez-Salazar, A. (2020). *Efecto de las condiciones de fermentación y secado, en las características físico químicas del cacao (Theobroma cacao L.); cultivar CCN 51*. Obtenido de:
<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4334/chavez-salazar-angel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cheng, Y. C., Sheen, J. M., Hu, W. L., & Hung, Y. C. (2017). Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8526438. <https://doi.org/10.1155/2017/8526438>
- Chumaña, O. A. (2022). *Determinación del contenido de antioxidantes y actividad antioxidante de placenta de cacao (Theobroma cacao L.), variedades clon CCN-51 y tipo nacional x Trinitario* (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ). Obtenido de:
<https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/6807/1/T-UTEQ-133.pdf>
- Crespo, D. (2018). *MC-F-007. Capítulo 7. Daño oxidativo y envejecimiento*. Obtenido de Universidad de Cantabria: <https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=708>
- Croteau, R., Kutchan, T., & Lewis, N. (2015). Natural Products (Secondary Metabolites). En B. Buchanan, R. Grisseim, R. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1250-1318). Hoboken, United States of America: Wiley-Blackwell
- Cuzcano, I. R. (2020). *Antocianinas, flavonoides, polifenoles totales y actividad antioxidante en granos de cacao (Theobroma cacao L.) frescos, fermentados, secos y tostados (nibs), clones ICS95 y ICS1*. (Tesis de pregrado de ingeniería agroindustrial), Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia, Ucayali-Perú. Obtenido de http://51.222.120.98/bitstream/unia/299/1/T084_70467546_T.pdf
- Dai, T., Chen, J., McClements, D., & Liu, C. (2019). Investigation the interaction between procyanidin dimer and α -glucosidase: Spectroscopic analyses and molecular docking simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.105>
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., Torre M., & Weigend., M. (2012). *Hoja botánica: Cacao*. (primera ed.). Lima, Perú: botconsult GmbH. Obtenido de:
http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf

- Fernández, E. C. J. (2016). *Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli) fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido* (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia). Obtenido de: <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/48095/1/Elena%20Cienfuegos-Jovellanos%20Fern%c3%a1ndez%20Tesis%20Doctoral%20n.pdf>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & function*, 10(2), 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
- García, J. P., Santana, A., Baruqui, D. L., & Suraci, N. (2018). The Cardiovascular effects of chocolate. *Reviews in cardiovascular medicine*, 19(4), 123–127. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2018.04.3187>
- Giacometti, J., Mazor, S., & Josić, D. (2015). Cocoa Processing and Impact on Composition. *Processing and Impact on Active Components in Food, Academic Press*, 73, 605–612. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00073-1>
- Gil, M., Uribe, D., Gallego, V., Bedoya, C., & Arango-Varela, S. (2021). Traceability of polyphenols in cocoa during the postharvest and industrialization processes and their biological antioxidant potential. *Heliyon*, 7(8), e07738. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07738>
- Goude, K., Adingra, K., Gbotognon, O., & Kouadio, P. (2019). Caracterización bioquímica, potencial nutricional y antioxidante de la placenta de cacao (*Theobroma Cacao* L.). *Annals Food Science and Technology*, 20 (3), 603–613. Obtenido de: https://afst.valahia.ro/wp-content/uploads/2022/09/IV.7_Goude.pdf
- Gulcin, I. (2020). Antioxidantes y métodos antioxidantes: una descripción actualizada. *Arco Toxicol* 94, 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Gutiérrez, J., Mondragón, P., García, L., Hernández, S., Ramírez, S., & Núñez, N. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 19 (4), 446–454. Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2014/rmq144h.pdf>
- Hall, H., Yuncong, L., Comerford, N., Arévalo, E., Zuñiga, L., Baligar, V., & Popenoe, H. (2010). Cover crops after phosphorus soil fractions and organic matter accumulation in a Peruvian cacao. *Agroforestry Systems*, 80(3), 447–455. doi:10.1007/s10457-010-9333-8
- Halliwell, B. (2012). Radicales libres y antioxidantes: actualizando una visión personal. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Jaimez, R., Barragan, L., Fernández, M., Wessjohann, L., Cedeño, G., Sotomayor, I., & Arteaga, F. (2022). *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. *PeerJ*, 10, e12676. <https://doi.org/10.7717/peerj.12676>

- Jalil, A. M., & Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health?. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 13(9), 2190–2219. <https://doi.org/10.3390/molecules13092190>
- Kim, Y., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2016). Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.3390/nu8010017>
- Lee, S., & Williamson, G. (2010). Cocoa polyphenols inhibit sucrose hydrolysis in Caco-2 cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24 (1), 659-659. https://doi.org/10.1096/fasebj.24.1_supplement.659.6
- Li, Y., Tanner, G., & Larkin, P. (1996). The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 89 – 101.
- Melo, T. S., Pires, T. C., Engelmann, J. V. P., Monteiro, A. L. O., Maciel, L. F., & Bispo, E. D. S. (2021). Evaluation of the content of bioactive compounds in cocoa beans during the fermentation process. *Journal of food science and technology*, 58(5), 1947–1957. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04706-w>
- Mesa, A. M., Zapata-Urbe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1-10.
- Mingle, C. E., & Newsome, A. L. (2020). An amended potassium persulfate ABTS antioxidant assay used for medicinal plant extracts revealed variable antioxidant capacity based upon plant extraction process. *bioRxiv*.
- Montagna, M. T., Diella, G., Triggiano, F., Caponio, G. R., De Giglio, O., Caggiano, G., Di Ciaula, A., & Portincasa, P. (2019). Chocolate, "Food of the Gods": History, Science, and Human Health. *International journal of environmental research and public health*, 16(24), 4960. <https://doi.org/10.3390/ijerph16244960>
- Morze, J., Schwedhelm, C., Bencic, A., Hoffmann, G., Boeing, H., Przybylowicz, K., & Schwingshackl, L. (2020). Chocolate and risk of chronic disease: a systematic review and dose-response meta-analysis. *European journal of nutrition*, 59(1), 389–397. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01914-9>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nediani, C., & Dinu, M. (2022). Oxidative Stress and Inflammation as Targets for Novel Preventive and Therapeutic Approaches in Non-Communicable Diseases II. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(5), 824. <https://doi.org/10.3390/antiox11050824>
- Nediani, C., & Giovannelli, L. (2020). Oxidative Stress and Inflammation as Targets for Novel Preventive and Therapeutic Approches in Non-Communicable Diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(4), 290. <https://doi.org/10.3390/antiox9040290>

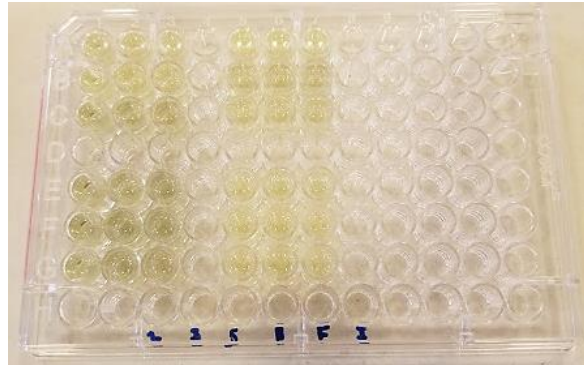
- Oficina de Referencia de Población. (2013). *Enfermedades No Transmisibles en América Latina y el Caribe: Usted es Clave para la Prevención*. Obtenido de: <https://www.prb.org/wp-content/uploads/2013/06/noncommunicable-diseases-latin-america-youth-datasheet.pdf>
- Oliviero, T., Capuano, E., Cämmerer, B., Fogliano, V. (2009). Influencia del tostado en la actividad antioxidante y formación de HMF del sistema modelo de cacao en grano. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 57, 147 – 152.
- Oracz, J., y Nebesny, E. (2016). Propiedades antioxidantes de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.): Influencia del cultivo y las condiciones de tueste. *International Journal of Food Properties*, 19(6), 1242-1258. 10.1080/10942912.2015.1071840
- Ortega, N., Romero, M., Macià, A., Reguant, j., Anglès, N., Morelló, J., Motilva, M. (2010). Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.005>.
- Pallares, A., Estupiñán, A., Perea, V., & López, L. (2016). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*, 29(2), 7-21. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n2-2016001>
- Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluación de la reacción de complejación de aluminio para el ensayo de contenido de flavonoides. *Food Analytical Methods*, 7, 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Prieto, J. M. (2012). Procedure: Preparation of DPPH Radical, and antioxidant scavenging assay. *DPPH Microplate Protocol*, 7-9.
- ProEcuador. (2015). *Ficha Sectorial: Cacao y Chocolate - Pro Ecuador*. Quito: ProEcuador. Obtenido de: <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/2018/04/Ficha-Sectorial-Cacao.pdf>
- Pucciarelli D. L. (2013). Cocoa and heart health: a historical review of the science. *Nutrients*, 5(10), 3854–3870. <https://doi.org/10.3390/nu5103854>
- Racine, K., Wiersema, B., Griffin, L., Essenmacher, L., Lee, AH. Hopfer, H., & Neilson, A. (2019). La polimerización de flavanoles es un predictor superior de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa en comparación con las concentraciones de flavanoles o polifenoles totales en los cacaos preparados mediante variaciones en la fermentación controlada y el tostado de los mismos granos de cacao crudos. *Antioxidantes*, 8 (12), 635. <https://doi.org/10.3390/antiox8120635>
- Redacción El Universo. (17 de agosto de 2021). Cacao ecuatoriano, entre los mejores del mundo. *El Universo*. Recuperado de: <https://www.eluniverso.com/noticias/economia/cacao-ecuadoriano-entre-los-mejores-del-mundo-nota/>

- Ried, K., Fakler, P., & Stocks, N. P. (2017). Effect of cocoa on blood pressure. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4), CD008893. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008893.pub3>
- Ryan, C. M. (2016). *Actividades antidiabéticas y antiobesidad del cacao (Theobroma cacao) a través de la inhibición de enzimas fisiológicas*. (tesis doctoral de Ciencia y Tecnología de los Alimentos), Virginia Tech. Obtenido de: https://vtchworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/75003/Ryan_CM_T_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ryan, C., Ye, L., O'Keefe, S., & Neilson, A. (2016). Unfermented and Fermented Cocoa Extracts as Inhibitors of Pancreatic α -Amylase, α -Glucosidase, and Pancreatic Lipase. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 30, 691. https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.691.30
- Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 1-12.
- Samanta, S., Sarkar, T., Chakraborty, R., Rebezov, M., Shariati, M. A., Thiruvengadam, M., & Rengasamy, K. R. R. (2022). Dark chocolate: An overview of its biological activity, processing, and fortification approaches. *Current research in food science*, 5, 1916–1943. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.10.017>
- Seyedsadjadi, N., & Grant, R. (2020). The Potential Benefit of Monitoring Oxidative Stress and Inflammation in the Prevention of Non-Communicable Diseases (NCDs). *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.3390/antiox10010015>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Stanley, T. H., Van Buiten, C. B., Baker, S. A., Elias, R. J., Anantheswaran, R. C., & Lambert, J. D. (2018). Impact of roasting on the flavan-3-ol composition, sensory-related chemistry, and *in vitro* pancreatic lipase inhibitory activity of cocoa beans. *Food chemistry*, 255, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.036>
- Šturm, L., & Poklar, N. (2020). Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review. *eFood*, 1(1), 24–37. <https://doi.org/10.2991/EFOOD.K.191029.001>
- Sukha, D. A., Butler, D. R., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). The use of an optimized assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *Journal of European Food Research and Technology* 226(3), 405-413. DOI. 10.1007/s00217-006-0551-2
- Tan, T. Y. C., Lim, X. Y., Yeo, J. H. H., Lee, S. W. H., & Lai, N. M. (2021). The Health Effects of Chocolate and Cocoa: A Systematic Review. *Nutrients*, 13(9), 2909. <https://doi.org/10.3390/nu13092909>

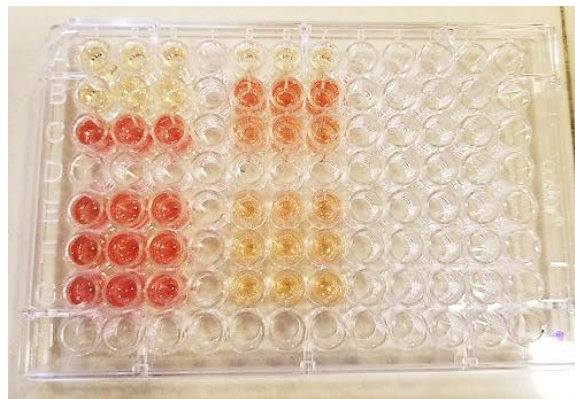
- Torres-Naranjo, M., Suárez, A., Gilardoni, G., Cartuche, L., Flores, P., & Morocho, V. (2016). Chemical constituents of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and its *in vitro* α -amilase and α -glucosidase inhibitory activities. *Molecules*, 21(11), 1461.
- Urbańska, B., & Kowalska, J. (2019). Comparison of the Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Chocolate Obtained from Roasted and Unroasted Cocoa Beans from Different Regions of the World. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(8), 283. <https://doi.org/10.3390/antiox8080283>
- Urbańska, B., Derewiaka, D., Lenart, A., & Kowalska, J. (2019). Cambios en la composición y contenido de polifenoles en el chocolate como resultado del método de pretratamiento de los granos de cacao y el proceso tecnológico. *Eur Food Res Technol*, 245, 2101–2112. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03333-w>
- Vargas, O. A., Vite, H., & Quezada, J. M. (2021). Análisis comparativo del impacto económico del cultivo del cacao en Ecuador del primer semestre 2019 versus el primer semestre 2020. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 4(2), 169-179.
- Vázquez, A., Ovando, I., Adriano, L., Betancur, D., & Salvador, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 66(3). Obtenido de: <http://www.alanrevista.org/ediciones/2016/3/art-10/>
- Verna R. (2013). The history and science of chocolate. *The Malaysian journal of pathology*, 35(2), 111–121.
- World Health Organization. (2018). *Noncommunicable Diseases Country Profiles 2018*, Geneva. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Obtenido de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274512/9789241514620-eng.pdf>
- World Health Organization. (2022). *Noncommunicable diseases progress monitor 2022*. Geneva. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Obtenido de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/353048/9789240047761-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Yingying, F., Haijuan, N., Haoyu, Z., Penghang X., & Bo, L. (2022). Mechanism of inhibition of α -glucosidase activity by bavachalcone. *Food Science and Technology*, 42, 123-421. <https://doi.org/10.1590/fst.123421>
- Zapata, S., Tamayo, T., & Rojano, B. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 391-404. Obtenido de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000300007&lng=es&tlng=pt.

Anexos

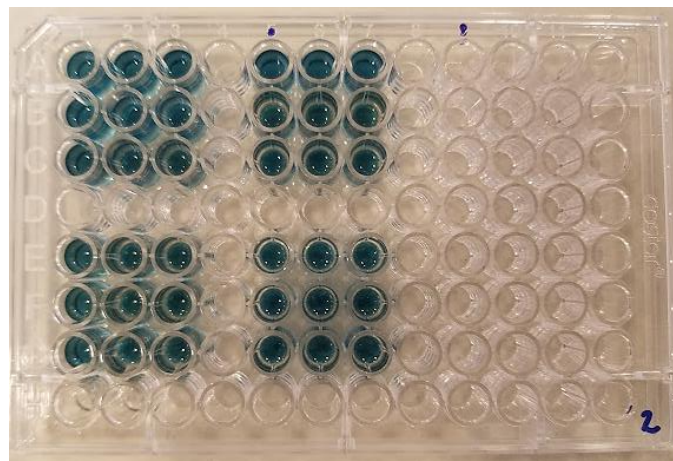
Anexo A. Test Folin-Ciocalteu para la determinación de Contenido fenólico total, mediante microtitulación.



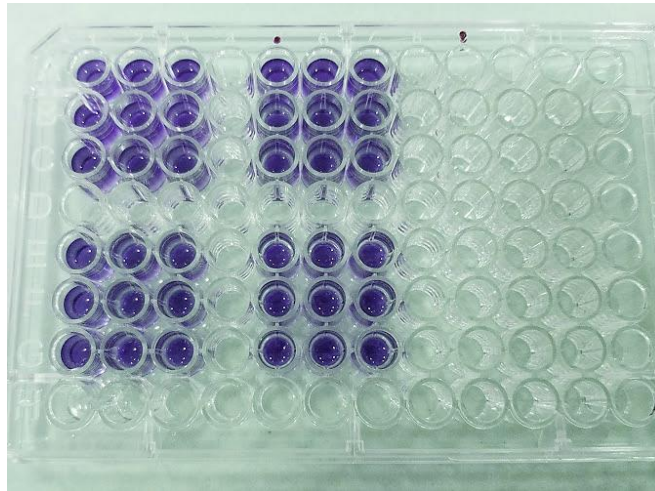
Anexo B. Método del cloruro de aluminio para la determinación del Contenido de flavonoides totales, mediante microtitulación.



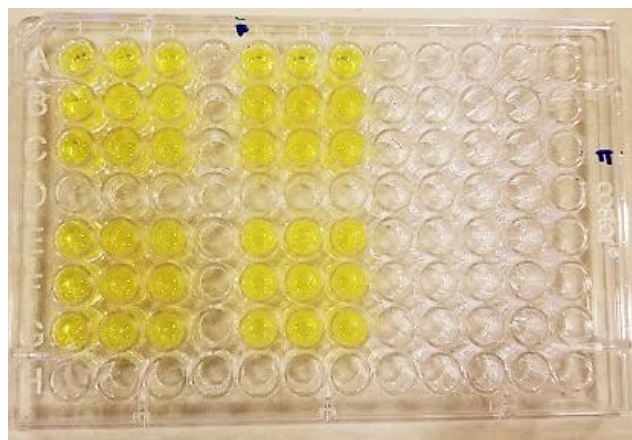
Anexo C. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS^{•+} por microtitulación.



Anexo D. Determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH[•] por microtitulación.

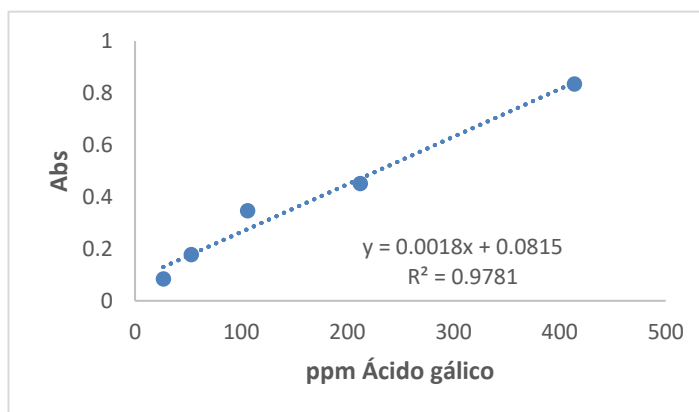


Anexo E. Ensayo espectrofotométrico in vitro de inhibición de la α -glucosidasa mediante microtitulación.



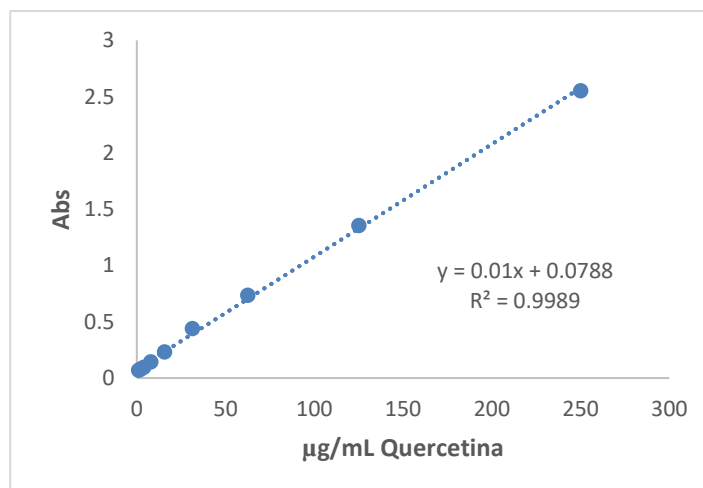
Anexo F. Curva de calibración para la determinación del contenido fenólico total, empleándose ácido gálico como patrón estándar.

ppm A. Gálico	Abs
26.5	0.0845
53	0.178
106	0.3465
212	0.451
414	0.835



Anexo G. Curva de calibración para la determinación de flavonoides totales, empleándose quercetina como patrón estándar.

µg/mL	Abs
250	2.55125
125	1.355
62.5	0.73475
31.25	0.438
15.625	0.23125
7.8125	0.144
3.90625	0.094
1.953125	0.07875
0.9765625	0.069



Anexo H. Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo ABTS^{•+}, empleándose ácido ascórbico como patrón estándar.

mg/mL	Abs
0.184	0.043
0.092	0.58925
0.046	0.96825
0.023	1.193
0.0115	1.24825
0.00575	1.34775
0.002875	1.357
0.0014375	1.35325
0.00071875	1.36325
0.000359375	1.32425

