



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

Revalorización de residuos de la Industria de Chocolate para la obtención de biomoléculas de interés industrial a partir de la cascarilla de cacao.

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Química

Autora:

Tamara Michelle Bernal Cedillo
C.I.: 0105306666
Correo electrónico: tamibernal@hotmail.com

Director:

Mgt. Jorge Washington Delgado Noboa
C.I.: 0103599411
Correo electrónico: jorge.delgado@ucuenca.edu.ec

Codirectora:

PhD. Adriana Laca Pérez
Universidad de Oviedo – España
Correo electrónico: lacaadriana@uniovi.es

Cuenca, Ecuador

05-mayo-2021



RESUMEN

El constante crecimiento de la población a nivel mundial implica un aumento de la contaminación ambiental, debido primordialmente a emisiones atmosféricas, aguas residuales y desechos sólidos. Es por esto que se necesita un cambio en el modelo actual de economía lineal (de la cuna a la tumba) basado en la idea de usar y desechar, al modelo de economía circular (de la cuna a la cuna) que implica reducir, reutilizar y reciclar.

Concretamente, este concepto de economía circular es aplicable al tratamiento de residuos de la industria alimentaria, siendo uno de ellos la cascarilla de cacao. Ésta representa entre 12 y 20% de la semilla de cacao y se estima su producción mundial en aproximadamente 700,000 toneladas por año. La cascarilla de cacao es un subproducto rico en fibras, antioxidantes y compuestos fenólicos y es un tipo de desecho alimentario que contiene diversos compuestos bioactivos que podrían ser empleados en el sector biotecnológico.

Debido al aumento del consumo de derivados del chocolate y la inherente generación de residuos, en el presente proyecto se analizó el efecto de tratamientos de hidrólisis en la revalorización de cascarilla de cacao para la obtención de biomoléculas de interés industrial. Los resultados mostraron que los tratamientos de hidrólisis térmica permiten incrementar la extracción de compuestos bioactivos. Así, en ausencia de este tratamiento se obtuvieron, dependiendo del pH, valores entre 7.08 y 13.78 mg Trolox Equivalente/g residuo seco para la capacidad antioxidante y entre 4.02 y 6.08 mg Ácido Gálico Equivalente/g residuo seco para el contenido de polifenoles totales. Sin embargo, los máximos valores obtenidos al someter a las muestras de cascarilla de cacao a tratamientos hidrotérmicos fueron de 38.13 mg TE/g para la capacidad antioxidante, y 14.59 mg GAE/g para el contenido de fenoles totales.

Palabras clave: Cascarilla de cacao. Capacidad antioxidante. Contenido de fenoles totales. Hidrólisis hidrotérmica.



ABSTRACT

The constant growth of the world population implies an increase in environmental pollution, mainly due to atmospheric emissions, sewage and solid waste. This is why a change is needed in the current linear economy model (from cradle to grave), based on the idea of using and discarding, to the circular economy model (from cradle to cradle) that involves reducing, reusing and recycle.

Precisely, this concept of circular economy is applicable to the treatment of waste from the food industry, i.e., the cocoa bean shell. It represents 12 – 20% of the cocoa seed and its world production is estimated at approximately 700,000 tons per year. Cocoa bean shell is a by-product rich in fibers, antioxidants and phenolic compounds and contains various bioactive compounds that could be used in the biotechnology sector.

Due to the increase in the consumption of chocolate derivatives and the inherent generation of waste, this project analysed the effect of hydrolysis treatments on the revaluation of cocoa bean shell to obtain biomolecules of industrial interest. It was observed that the treatments of thermal hydrolysis allow an important increase in the extraction of bioactive compounds, so in the absence of this treatment, values between 7.08 and 13.78 mg TE/g dry weight for antioxidant capacity and between 4.02 and 6.08 mg GAE/g dry weight for total phenolic content were obtained at different pHs. However, the maximum values obtained when the cocoa bean shell were treated by hydrothermal hydrolysis were 38.13 mg TE/g for the antioxidant capacity and 14.59 mg GAE/g for the total phenolic content.

Keywords: Cocoa bean shell. Antioxidant activity. Total phenolic content. Thermal hydrolysis.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	9
DEDICATORIA.....	12
AGRADECIMIENTOS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. CONTENIDO TEÓRICO.....	16
2.1. EL CACAO.....	16
2.1.1. Estructura y variedades.....	16
2.1.2. Producción de granos de cacao.....	18
2.1.1. Mercado y comercialización del cacao.....	21
2.1.2. Producción de cacao en Ecuador.....	23
2.1.3. Procesamiento industrial de los granos de cacao.....	26
2.1.1. Industria del chocolate en el mundo.....	31
2.1.2. Industria del chocolate en Ecuador.....	32
2.1.3. Industria del chocolate en Asturias – España.....	32
2.1.4. Cascarilla de cacao.....	34
2.1.5. Economía circular en la gestión de cascarilla de cacao.....	36
2.2. TRATAMIENTOS DE HIDRÓLISIS.....	38
2.2.1. Hidrólisis Hidrotérmica.....	38
2.2.2. Hidrólisis Ácido-térmica o alcalino-térmica.....	39
2.3. ANTIOXIDANTES.....	39
2.3.1. Clasificación.....	40
2.3.2. Capacidad Antioxidante y su determinación.....	41
2.3.3. Compuestos fenólicos.....	41
2.3.4. Determinación del contenido de fenoles totales.....	42
3. METODOLOGÍA.....	43
3.1. DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESO.....	43
3.2. ESQUEMA DE LOS PROCESOS DE CUANTIFICACIÓN REALIZADOS.....	44
3.3. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO DE LA MUESTRA.....	45
3.4. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS SOLUBLES EN AGUA.....	46



3.5.	TRATAMIENTOS DE HIDRÓLISIS	47
3.5.1.	<i>Hidrólisis Hidrotérmica</i>	48
3.5.2.	<i>Hidrólisis Ácido-Térmica</i>	48
3.5.3.	<i>Hidrólisis Alcalino-Térmica</i>	49
3.6.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	49
3.7.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	52
4.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
4.1.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	55
4.2.	DISCUSIÓN Y CONDICIONES ÓPTIMAS DE OPERACIÓN	61
5.	CONCLUSIONES	66
6.	RECOMENDACIONES	67
	REFERENCIAS	68

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura del fruto de cacao. Fuente: (Beckett, 2008).	16
Figura 2. Diferencia del fruto de cacao Criollo, Forastero y Trinitario. Fuente: (Club del Cacao, 2018).	17
Figura 3. Fruto de cacao Nacional. Fuente: (Anecacao, 2015).	18
Figura 4. Etapas de procesamiento para granos de cacao en la plantación. Adaptado de: (Hartel et al., 2018).....	18
Figura 5. Fermentación de los granos de cacao, a) sobre hojas de banano y b) en cajones Fuente: (Beckett, 2008).	20
Figura 6. Etapa de secado de los granos de cacao. Fuente: (Beckett, 2008).	21
Figura 7. Producción de cacao en grano por país (promedio 2010-2019). Fuente: (FAOSTAT, 2020a). 21	
Figura 8. Países con mayor producción de cacao en grano en 2019. Fuente: (FAOSTAT, 2020a)	22
Figura 9. Mayores exportadores de cacao en el mundo. Fuente: (FAOSTAT, 2020b).....	24
Figura 10. Producción de cacao a nivel nacional. Adaptado de: (INEC, 2002)	25
Figura 11. Producción mundial de cacao fino de aroma para el año 2011. Adaptado de: (Sánchez, 2013).....	26
Figura 12. Proceso industrial de elaboración de chocolate. Adaptado de: (Hartel et al., 2018).	27
Figura 13. Diagrama esquemático de un refinador de cinco rodillos. Adaptado de: (Afoakwa, 2010). ...	29
Figura 14. Ilustración de la mecánica interna de un equipo de conchado. Fuente: (Afoakwa, 2010).	30
Figura 15. Regímenes de temperatura y grado de estabilidad en seis formas polimórficas de manteca de cacao. Adaptado de: (Afoakwa, 2010).	30
Figura 16. Principales países importadores de cacao en grano en 2019. Fuente: (FAOSTAT, 2020a) ..	33
Figura 17. Industria de chocolate en España. Fuente: (Produlce, 2019).....	33
Figura 18. Producción de cacao en grano y generación de biomasa residual. Fuente: (Vásquez et al., 2019).....	34
Figura 19. Esquema del concepto de Economía Circular. Adaptado de: (Moreno, 2020).....	37
Figura 20. Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Adaptado de: (Igbinalolor & Onilude, 2013).	38
Figura 21. Neutralización de un radical libre por un antioxidante. Fuente: (Criado & Moya, 2009).	40
Figura 22. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.....	43
Figura 23. Esquema de los procesos realizados.	44
Figura 24. Estufa Gallenkamp Hotbox Oven, Size 1.....	45
Figura 25. Balanza analítica Adventurer Analytical Electronic Balance, AX224 – OHAUS.....	46
Figura 26. Centrífuga Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific.....	47
Figura 27. pH-metro Basic 20+, Crison Instruments.	47
Figura 28. Autoclave AES 75, Raypa.	48
Figura 29. Baño hidrotérmico MEMMERT Type: WNB 10.....	50
Figura 30. Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios Alpha.	51



Figura 31. Patrones de Trolox para realizar la recta de calibrado de capacidad antioxidante. De izquierda a derecha: Blanco (0 ppm), 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm. 51

Figura 32. Recta de calibrado para determinar la capacidad antioxidante. 52

Figura 33. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS™ 150. 53

Figura 34. Patrones de ácido gálico para realizar la recta de calibrado del contenido de polifenoles totales. De izquierda a derecha: 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm. 54

Figura 35. Recta de calibrado para determinar el contenido de polifenoles totales. 54

Figura 36. Evolución con el tiempo de tratamiento hidrotérmico de la capacidad antioxidante de los hidrolizados de cascarilla de cacao y a distintos pH. 57

Figura 37. Evolución de los hidrolizados de cascarilla de cacao en el tiempo y a distintos pH en la determinación del contenido de polifenoles totales. 58

Figura 38. Capacidad antioxidante (azul), contenido de fenoles totales (naranja) y relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales (gris). a) pH 2, b) pH 3 y c) pH 10. 59

Figura 39. Capacidad antioxidante (azul), contenido de fenoles totales (naranja) y relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales (gris) a pH 5. 60

Figura 40. Capacidad antioxidante (azul), contenido de fenoles totales (naranja) y relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales (gris). a) pH 4 y b) pH 8. 61



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Principal producción de Ecuador. Adaptado de: (FAOSTAT, 2020b)</i>	23
Tabla 2. <i>Principales productos de exportación en Ecuador. Adaptado de: (FAOSTAT, 2020b).</i>	24
Tabla 3. <i>Principales empresas de confitería del mundo que fabrican algún tipo de chocolate, por valor neto de ventas de confitería en 2018. Adaptado de: (International Cocoa Organization, 2020).</i>	31
Tabla 4. <i>Principales productos y biocomponentes obtenidos de la biomasa residual del cacao. Adaptado de: (Vásquez et al., 2019).</i>	35
Tabla 5. <i>Composición química de la cascarilla de cacao. Adaptado de: (Vásquez et al., 2019).</i>	36
Tabla 6. <i>Clasificación de los Antioxidantes. Fuente: (Criado & Moya, 2009).</i>	40
Tabla 7. <i>Clasificación de los compuestos polifenólicos. Fuente: (Mercado-Mercado et al., 2013).</i>	42
Tabla 8. <i>Porcentaje de humedad de los diferentes lotes de cascarilla de cacao analizados.</i>	55
Tabla 9. <i>Porcentaje de residuo seco de los diferentes lotes de cascarilla de cacao analizados.</i>	56
Tabla 10. <i>Capacidad Antioxidante en mg TE/g rs.</i>	62
Tabla 11. <i>Contenido de Fenoles Totales en mg GAE/g rs.</i>	63



ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1</i>	46
<i>Ecuación 2</i>	46
<i>Ecuación 3</i>	50
<i>Ecuación 4</i>	53



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Tamara Michelle Bernal Cedillo en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Revalorización de residuos de la Industria de Chocolate para la obtención de biomoléculas de interés industrial a partir de la cascarilla de cacao”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 05 de mayo de 2021.

Tamara Michelle Bernal Cedillo

C.I: 0105306666



Cláusula de Propiedad Intelectual

Tamara Michelle Bernal Cedillo, autora del trabajo de titulación “Revalorización de residuos de la Industria de Chocolate para la obtención de biomoléculas de interés industrial a partir de la cascarilla de cacao”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 05 de mayo de 2021.

Tamara Michelle Bernal Cedillo

C.I: 0105306666



DEDICATORIA

Este logro va dedicado a mi padre, mi superhéroe y mi primer amor, quien ha dedicado cada día de su vida para que mis hermanos y yo tengamos todo lo que soñamos, por impulsarnos siempre a cumplir nuestras metas y sueños, y enseñarnos que no hay nada imposible si nos esforzamos y trabajamos por ello. A ti papá que has sido mi cómplice en aventuras y locuras, que me has dado lo mejor de tu vida y todo tu amor siempre.

Con todo mi corazón a mi madre, la mujer que desde el día uno luchó por sus sueños y nos enseñó a hacer lo mismo, siempre con mucho amor y poniendo nuestro cien por ciento e incluso más. A ti mamá que has estado conmigo en los momentos felices y también en los más tristes, a mi mejor amiga y la madre y mujer que busco ser. Aquella mujer que cada día de su vida trabaja por ser la mejor versión de si misma, es tierna, amorosa y dedicada a su familia como ninguna.

A la mujer que es mi base y mi mundo entero, mi abuelita Blanquita, una mujer luchadora y que nunca permitió que nada la venciera, quien trabajó y dio su vida para que toda la familia tuviera lo mejor y no nos faltara nada. A usted mi angelito, a quien he tenido la dicha de disfrutar todos los días de mi vida y quien me ha apoyado y cuidado siempre.

A mis hermanos Calos y Karla, quienes son mi apoyo constante y mi inspiración para triunfar y ser una mejor persona. A ustedes por ser mis modelos, mi guía y mi soporte en momentos difíciles, así como en los momentos más felices.

A los cinco terremotos de casa, Amelia, Joaquín, Valentina, Daniel y pequeña en camino, mis sobrinos y las personitas que me incentivan a esforzarme más cada día.

A Juan Fernando, el amor de mi vida, quien me ha impulsado a seguir adelante y me ha enseñado a confiar en mí y en mis conocimientos. La persona con quien comparto cada sueño y cada locura, quien ha estado en los días más felices y en los tristes también, un hombre inteligente, cariñoso y con un corazón gigante, mi mejor amigo.



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la dicha de vivir y luchar por mis sueños, quien ha estado conmigo en cada momento y me ha demostrado que soy capaz de cumplir lo que me proponga si creo en él.

A mis padres, quienes han dado todo por mis hermanos y por mí, gracias por su apoyo incondicional, por impulsarme a seguir mis sueños, por guiarme y ser más que mis padres, mis mejores amigos.

A la mujer que es mi segunda madre, gracias al ángel más bonito que Dios puso en mi vida, a mi abuelita Blanquita, mi pilar de vida.

A mis hermanos, por su apoyo en todo momento y su cariño, por ser mi guía y mis modelos a seguir.

A Juan Fernando, por ser mi compañero de aventuras y de vida, por su gran paciencia y amor y por apoyarme en cada etapa e impulsarme a seguir, incluso cuando yo no lo creía posible.

A la Universidad de Cuenca, que me proporcionó todas las herramientas para ser una excelente profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y permitirme aprender de los mejores investigadores y seres humanos que tuve la oportunidad de llamar mis maestros.

A la Universidad de Oviedo, en especial a Mario Díaz, por permitirme llevar a cabo este trabajo de titulación en el grupo de Tecnología de Bioprosesos y Reactores.

A mi tutor de la Universidad de Cuenca, Jorge Delgado, por su apoyo incondicional, dedicación y esfuerzo, por compartir conmigo su conocimiento y ayudarme durante este proceso diferente de titulación, por confiar en mí y permitirme cumplir este sueño.

A mi tutora de la Universidad de Oviedo, Adriana Laca, gracias infinitas por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación en el grupo de investigación TBR y por su guía y apoyo constante.

A Alexandra Guanuchi y Mayra Vera por toda su ayuda y apoyo a lo largo de mi carrera, por siempre motivarme e incentivar a seguir adelante en cada idea o proyecto que he realizado.

A Marta Sánchez, por su ayuda en todo momento, por enseñarme y guiarme durante cada etapa, y por ayudarme siempre que era necesario.

A mis compañeros y amigos.



1. INTRODUCCIÓN

Los problemas de contaminación ambiental que se atraviesan en la actualidad tienen su origen fundamentalmente por causas derivadas de la actividad humana, siendo la generación de residuos uno de los principales problemas de la sociedad actual (Borrallo, 2019). Los residuos alimentarios son un inconveniente a nivel mundial debido a razones económicas, ambientales y de seguridad alimentaria.

Estos problemas no son exclusivos de los países desarrollados, siendo también parte de países como Ecuador, pero a su vez la industria alimentaria forma parte del producto interno bruto (PIB). Es así que en el año 2018 el ingreso nacional por el cultivo de banano, café y cacao fue de 134'435,000 de dólares y por la elaboración de cacao, chocolate y productos de confitería fue de 103'108,000 de dólares (Banco Central del Ecuador, 2019).

En el caso específico de la industria cacaotera se utiliza primordialmente la almendra de cacao, lo que genera un 90% de residuos con respecto al peso total del fruto. Para la industrialización de los granos de cacao se aprovecha aproximadamente el 85% y el 15% es considerado desecho (Terán, 2019).

La cascarilla de cacao es la porción exterior de los granos que recubren las semillas y son un producto de desecho del proceso de tostado durante la producción del chocolate. Este subproducto es rico en fibras y antioxidantes y es un tipo de desecho alimentario que generalmente contiene diversos compuestos bioactivos que podrían ser empleados en el sector biotecnológico (Grillo et al., 2019).

Varios estudios exploraron el potencial de la cascarilla de cacao para reemplazar una parte de la dieta animal habitual, para la generación de biocombustibles, usos como adsorbente y colorante, en la industria alimentaria como en snacks de maíz enriquecidos con cáscara de cacao, y para suprimir las malezas en cultivos de frutas perennes, jardines, paisajes urbanos y, ocasionalmente, en cultivos de hortalizas en sistemas de producción orgánica (Vásquez et al., 2019).

Nuevos estudios como el de Panak Balentić et al. (2018) indican el potencial de la cascarilla de cacao para la obtención de antioxidantes, los mismos que aportan a la evidencia química, bioquímica, clínica y epidemiológica, en donde los antioxidantes resultan adecuados para la prevención o la aparición tardía del cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Se considera que los antioxidantes ejercen sus efectos atenuando los eventos oxidativos que contribuyen a la generación de estas enfermedades (Rice-Evans



& Miller, 1995; Sridhar & Charles, 2019). Además, en las últimas dos décadas, los polifenoles han atraído el interés de la comunidad científica principalmente por sus propiedades beneficiosas para la salud que se han atribuido en la mayoría de los casos a sus propiedades antioxidantes. Los polifenoles se pueden utilizar como aditivos alimentarios, nutraceuticos y también en cosmética (Bouras et al., 2015). Los compuestos polifenólicos suelen acumularse en las partes externas de las plantas como cáscaras, cascarilla, hollejos, etc., pero existe escasa información sobre el contenido polifenólico de la cascarilla de cacao (Grillo et al., 2019; Lecumberri et al., 2007).

Los métodos tradicionales para la extracción de este tipo de compuestos se basan en procesos de molienda, maceración y extracción Soxhlet, sin embargo, estas tecnologías presentan desventajas que involucran el uso de elevadas cantidades de solventes, que en muchos casos pueden ser tóxicos y consumen tiempo y energía. Hoy en día, se apuestan por otras tecnologías como la hidrólisis ácida, básica, hidrotérmica y enzimática como una herramienta potencial para reducir la cantidad de solvente, el tiempo de tratamiento y la temperatura, así como el consumo de energía, mejorando de esta manera la recuperación de compuestos valiosos con menores costes (Barba et al., 2013).

Los procesos de hidrólisis presentan grandes ventajas como la disminución del impacto ambiental, la baja generación de subproductos inhibidores (Hidroximetilfurfural (HMF), furfural, ácido acético), menor daño de los equipos utilizados (debido a que se usan pH moderados), y el buen rendimiento del proceso (A. Díaz, 2015).

Finalmente, debido al continuo aumento de la demanda de derivados del cacao es fundamental realizar más estudios para ayudar a los productores de chocolate a evaluar la posibilidad de industrializar sus subproductos y mejorar la sostenibilidad ambiental (Recanati et al., 2018). Por lo antes mencionado, con este estudio se busca revalorizar los residuos de la industria cacaotera, mediante procesos de hidrólisis, para la obtención de biomoléculas de interés como antioxidantes y compuestos fenólicos; cumpliendo de esta manera uno de los principios de economía circular y que tiene como objetivo transformar los productos que se encuentran al final de su cadena productiva en recursos como materia prima para nuevas industrias (Grillo et al., 2019).

2. CONTENIDO TEÓRICO

2.1. El cacao

El árbol *Theobroma cacao* o más comúnmente conocido como cacao tiene su origen en Sur y Centro América, pero actualmente se cultiva en ambientes adecuados entre 20° - 30° norte y sur. Estas áreas presentan una temperatura promedio alta (≥ 27 °C) durante todo el año y una humedad elevada constante debido a sus abundantes lluvias.

Desde la antigüedad, los granos de cacao eran muy apreciados, se utilizaban como moneda de intercambio (dinero) y como materia prima para producir una bebida conocida como chocolatl. Cristóbal Colón llevó algunos granos de cacao a Europa, pero fue solo después de que los españoles conquistaran México que Hernán Cortés introdujo la bebida en España en la década de 1520, pero permaneció prácticamente desconocida en el resto de Europa durante casi cien años, llegando a Italia en 1606 y a Francia en 1657. Esta bebida era muy cara y primordialmente para la aristocracia, por lo que, su difusión se producía a menudo a través de conexiones entre familias poderosas (Beckett, 2008).

En la actualidad, los granos de cacao tienen gran importancia como materia prima en la industria alimentaria, especialmente en confitería, además de la industria cosmética y farmacéutica.

2.1.1. Estructura y variedades

El fruto de cacao está compuesto por una corteza rugosa o cáscara externa de aproximadamente 4 cm de espesor, dentro de la cual se encuentra una pulpa aromática, viscosa, dulce y comestible llamada mucílago, rico en azúcares y que encierra entre 30 a 50 granos de cacao (mazorca). Estos granos tienen forma de judías y están protegidos por una cobertura fibrosa llamada cascarilla (Figura 1) (Carrasco, 2015).

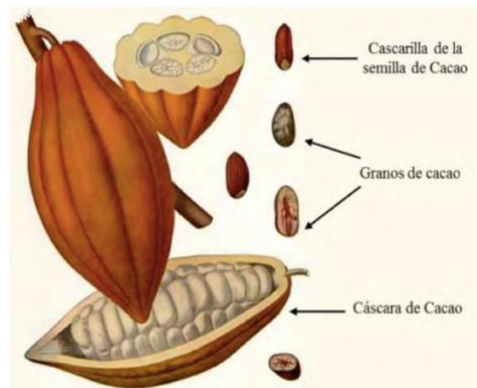


Figura 1. Estructura del fruto de cacao. Fuente: (Beckett, 2008).

Existen cuatro variedades de cacao (Afoakwa, 2010; FAO, 1984), las cuales se describen a continuación y la diferencia entre la forma y color de sus frutos se muestra en las figuras 2 y 3.

- ◆ **Criollo:** originario de Centroamérica y Sudamérica, las islas del Caribe y Sri Lanka. Esta variedad es muy sensible a plagas y cambios ambientales por lo que representa alrededor del 5% de la producción mundial de cacao. Cuando su fruto está maduro, es largo, amarillo o rojo, con surcos profundos y grandes verrugas. Esta variedad es de muy buena calidad y se cultiva principalmente en América.
- ◆ **Forastero:** es la variedad más común y es nativo de la cuenca del Amazonas. Su producción mundial es aproximadamente 80%. Su fruto es corto, amarillo, liso sin verrugas, con surcos poco profundos y sus granos son más pequeños, más planos y morados. En cuanto a calidad, esta variedad no es tan apetecida como el Criollo. Se cultiva principalmente en Brasil, Ecuador y África occidental.
- ◆ **Trinitario:** es un híbrido de Criollo y Forastero. Su fruto es largo o corto, rojo y amarillo, es más resistente a las enfermedades y produce cacao de buena calidad. Se cultiva en Venezuela, el Caribe, México, Colombia y Asia.

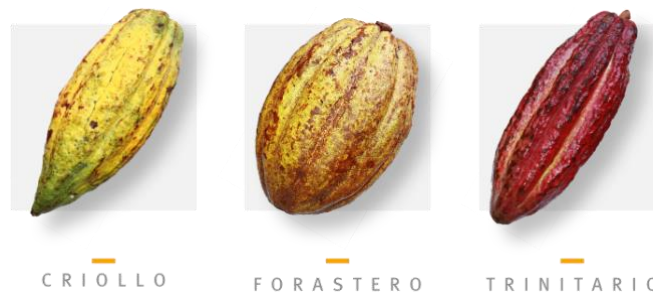


Figura 2. Diferencia del fruto de cacao Criollo, Forastero y Trinitario. Fuente: (Club del Cacao, 2018).

- ◆ **Nacional:** es una variedad que se cultiva en Ecuador. Su fruto presenta un color amarillo intenso, cáscara rugosa y surcos bien pronunciados. Esta variedad es reconocida a nivel mundial por su aroma floral y por ser un *cacao fino* o *de aroma* (Carrasco, 2015). Además, el clon (referido al conjunto de organismos o células que son idénticos genéticamente y originados por reproducción asexual) CCN-51 (Colección Castro Naranjal) fue obtenido por Homero Castro en 1965 de varios cultivares de cacao (Iquitos, Criollo y Amelonado), resistente a diferentes plagas y de alta productividad. Este cultivar CCN-51 es reconocido en mercados

especializados por su aroma, lo que ha incrementado su producción en la actualidad (Villamizar-Jaimes & López-Giraldo, 2016).



Figura 3. Fruto de cacao Nacional. Fuente: (Anecacao, 2015).

2.1.2. Producción de granos de cacao

La Figura 4 representa las etapas a seguir para la producción de granos de cacao desde su cultivo hasta la exportación o transporte para su posterior procesamiento industrial.

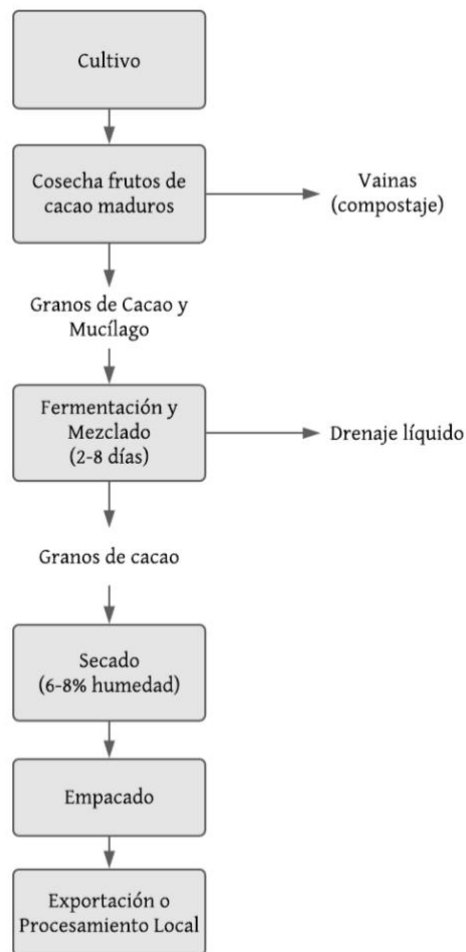


Figura 4. Etapas de procesamiento para granos de cacao en la plantación. Adaptado de: (Hartel et al., 2018).



a) Cultivo y cosecha

El fruto de cacao se desarrolla a partir de flores polinizadas y crece fuera de los troncos y las ramas inferiores del árbol. Como se desarrolla mejor a la sombra, el árbol de cacao generalmente crece debajo de una copa de árboles más altos, y se tarda aproximadamente 180 días en pasar de la polinización a la maduración de las vainas (Hartel et al., 2018).

Los frutos se cortan en su momento óptimo de madurez, lo que se determina por el color y el sonido del fruto al ser golpeado. El proceso de transformación del cacao recolectado en campo hasta convertirlo en un producto comercializable recibe el nombre de *beneficiado del cacao* y es fundamental para la obtención de un grano de buena calidad y permitir su comercialización correcta, lográndose conservar el sabor y aroma inconfundible del cacao, que determinará su calidad (Oliveras, 2007).

b) Fermentación

La fermentación es una de las etapas más importantes en el proceso debido a que es esencial para producir un buen sabor final en el chocolate. Consiste en almacenar los granos frescos en cajones aproximadamente por 4 a 7 días para propiciar la transformación bioquímica interna y externa del cacao y obtener granos en condiciones óptimas de sabor y aroma, mediante la acción de microorganismos, el aire y la temperatura. Para este proceso se apilan los granos y se cubren con hojas de banano o se dejan reposar en cajones, con el propósito de fermentar el mucílago que los cubre. En este proceso ocurre la hidrólisis de los azúcares que se transforman en alcohol y posteriormente en ácido acético, generando un pH entre 4 y 5 a una temperatura de 40 °C durante el proceso. Los granos no fermentados pueden ser prensados para producir manteca de cacao, sin embargo, el material de cacao sólido restante no suele utilizarse para elaborar chocolate (Oliveras, 2007).



Figura 5. Fermentación de los granos de cacao, a) sobre hojas de banano y b) en cajones
Fuente: (Beckett, 2008).

c) Lavado

El proceso de lavado se realiza para eliminar por completo toda la pulpa. Este paso se puede o no realizar, dependiendo del tipo de manufactura y producto a obtener.

d) Secado

Los granos deben ser secados para evitar el crecimiento de los mohos. Estos dan al chocolate un sabor fuerte, desagradable y por lo tanto impiden que se puedan utilizar en la fabricación. No se debe secar en exceso, ya que si el contenido de humedad es menor al 6% los granos se vuelven frágiles, lo que hace que el manejo y procesamiento posterior sea mucho más difícil. Cuando el clima lo permite, los granos pueden secarse al sol, extendiéndose durante el día en capas de aproximadamente 100 mm de grosor sobre esterillas, bandejas o en terrazas; se rastrillan a intervalos de tiempo, se apilan y se cubren por la noche o cuando llueve. Un problema importante del secado al sol es el riesgo de contaminación tanto del entorno, como de la granja y/o animales que son atraídos por los granos, lo que significa que deben tomarse precauciones al manejarlas cuando lleguen a la planta de procesamiento (Yi Chang, 2017).



Figura 6. Etapa de secado de los granos de cacao. Fuente: (Beckett, 2008).

e) Empacado

El empacado se realiza en sacos de yute o papel de aproximadamente sesenta kilos y se almacena en condiciones controladas de temperatura y humedad, para evitar el desarrollo de mohos, levaduras e insectos como las polillas; los parámetros de almacenamiento son: la humedad de los granos debe ser 7%, la humedad relativa del aire debe ser menor al 70%, y las pilas de sacos deben estar separadas entre sí por pasillos de un metro de ancho (International Cocoa Organization, 2016).

2.1.1. Mercado y comercialización del cacao

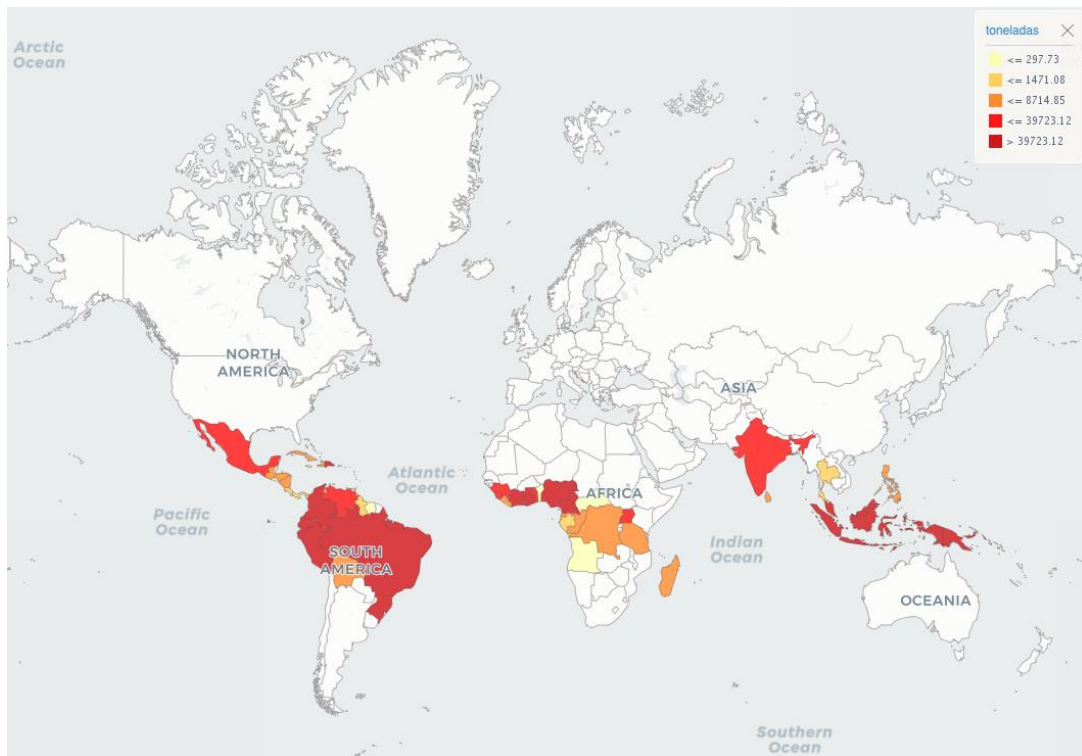


Figura 7. Producción de cacao en grano por país (promedio 2010-2019). Fuente: (FAOSTAT, 2020a).

Según la Organización Internacional del Cacao (ICCO), 50 millones de personas a nivel global dependen del cultivo de cacao para subsistir con un negocio que mueve más de USD 200,000 millones anuales, siendo una de las 6 principales actividades más lucrativas del mundo (FAO, 2020).

La producción mundial de cacao se realiza principalmente en países en desarrollo (Figura 7) entre los cuales los que están exportando grandes volúmenes de cacao en grano son Costa de Marfil, Ghana, Nigeria, Ecuador, entre otros (Figura 8). La producción y exportación de cacao en grano constituyen la base de la economía nacional de la mayoría de los países productores.

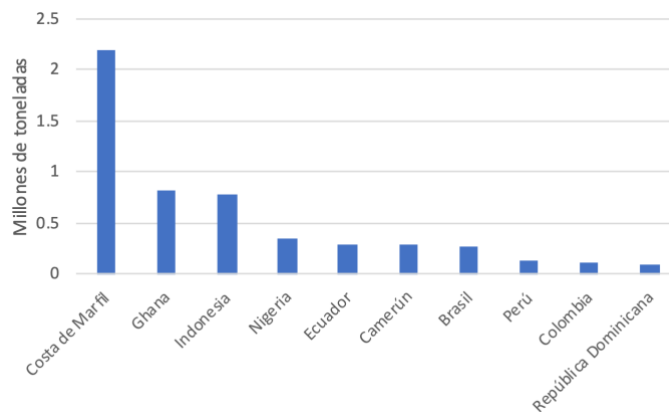


Figura 8. Países con mayor producción de cacao en grano en 2019. Fuente: (FAOSTAT, 2020a)

Según las estadísticas de la Organización de Agricultura y Comida de las Naciones Unidas (FAOSTAT, 2020a), los países de África lideran la producción mundial de cacao con un 68% del promedio entre los años 2010 a 2019, en segundo lugar se encuentra América con 16%, seguido por Asia con 15% y finalmente Oceanía con 1%.

Por otra parte, alrededor del 90% de la producción se exporta en forma de granos o productos de cacao semielaborados. Además, la mayoría de las importaciones de cacao y productos del cacao son de Europa (más de 1.2 millones de toneladas) y Estados Unidos (más de 0.4 millones de toneladas). El consumo de productos de chocolate está en constante aumento debido a la aparición de nuevos mercados en Europa del Este y Asia. (FAO, 2001).



2.1.2. Producción de cacao en Ecuador

Debido a la condición geográfica ecuatorial, los cultivos de cacao tienen más horas luz que en otros países, conjuntamente, otros fenómenos climáticos como las corrientes marinas: fría de Humboldt y la cálida de El Niño, producen ambientes propicios para el cultivo de cacao y café, ya que influyen en la maduración lenta del fruto y el desarrollo de azúcares, aromas y sabores. Además, la producción de cacao se lleva a cabo en medio de la bio-diversidad del país, lo que aporta sabores complejos y exóticos (FAO, 2020). Existe evidencia científica que ha demostrado que se pueden utilizar semillas de cacao ecuatoriano para producir en otras latitudes, pero no se han podido reproducir los sabores y aromas propios del cacao ecuatoriano (FAO, 2020).

En Ecuador, el cacao es conocido como *la pepa de oro* y su producción en grano ocupa el décimo lugar de la producción agrícola nacional, con un total de 283,680 toneladas en el año 2019 (Tabla 1), de las cuales, 270,943 toneladas fueron exportadas, posicionándolo como el quinto país exportador de cacao en el mundo (Figura 9).

Tabla 1. Principal producción de Ecuador. Adaptado de: (FAOSTAT, 2020b)

	Producto	Cantidad (toneladas)
1	Azúcar, caña	9'257,700
2	Bananos	6'583,477
3	Leche, entera fresca, vaca	2'400,000
4	Aceite, nuez de palma	2'275,948
5	Maíz	1'479,770
6	Arroz, cascara	1'099,686
7	Plátanos y otros	749,450
8	Arroz, cascara (arroz elaborado equivalente)	733,491
9	Carne, pollo	310,155
10	Cacao, en grano	283,680
11	Papas, patatas	275,346
12	Carne, cerdo	240,772
13	Fruta, fresca	233,923
14	Carne, ganado vacuno	229,441
15	Coliflor y brócoli	144,032
16	Naranjas	133,688
17	Huevos de gallina	133,114
18	Mangos, mangostanes y guayabas	105,585
19	Cebollas, chalotes, verdes	96,430
20	Sandías	84,239

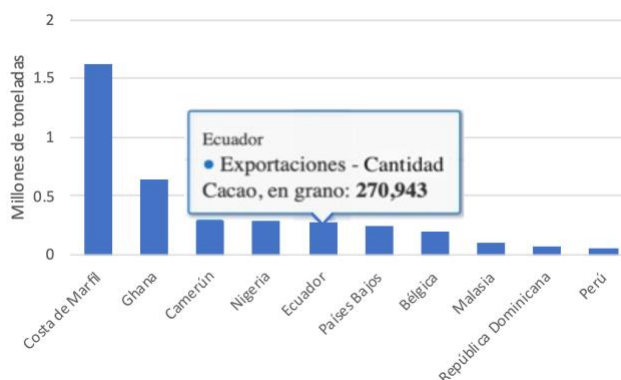


Figura 9. Mayores exportadores de cacao en el mundo. Fuente: (FAOSTAT, 2020b)

El cacao es un producto importante económicamente, por ejemplo, en el año 2017 se exportó cacao y sus derivados por un monto equivalente a 689 millones de dólares (USD), lo que posicionó al cacao como el quinto producto de exportación no petrolero (Banco Central del Ecuador, 2019). Por otra parte, en 2019 se exportó cacao en grano equivalente a 657,272 miles de dólares, cacao en pasta en 46,638 miles de dólares y manteca de cacao en 28,501 miles de dólares (Tabla 2).

Tabla 2. Principales productos de exportación en Ecuador. Adaptado de: (FAOSTAT, 2020b).

Producto	Cantidad (1000 USD)
Bananos	3'185,474
Productos orgánicos en bruto	893,355
Cacao, en grano	657,272
Fruta, preparada	190,572
Hortalizas, congeladas	147,394
Aceite, palma	126,848
Plátanos y otros	125,114
Tabaco bruto	77,244
Café, extractos	70,930
Fruta, fresca	48,177
Cacao, pasta	46,638
Mangos, mangostanes y guayabas	42,703
Piña tropical	42,694
Cacao, manteca	28,501
Fibras, cultivos	28,015
Azúcar, dulces, confitería	27,101
Jugo, frutas	24,935
Caquis	21,064
Azúcar, refinada	19,077

Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), el sector cacaotero contribuye con el 5% de la población económicamente activa nacional y el 15% de la rural, lo que representa una base fundamental de la economía familiar costera del país, de las estribaciones de las montañas de los Andes y de la Amazonia ecuatoriana (Anecacao, 2019). Existen alrededor de 120 mil productores de cacao que frecuentemente combinan su cultivo con el de café.

La producción de cacao a nivel nacional se encuentra distribuido en la mayoría de las provincias del país, concentrándose en la región Costa en un 84%, Sierra en 8% y en el resto del país en un 8%. Las principales provincias con mayor porcentaje de participación respecto a la superficie de cultivo se muestran en la Figura 10.

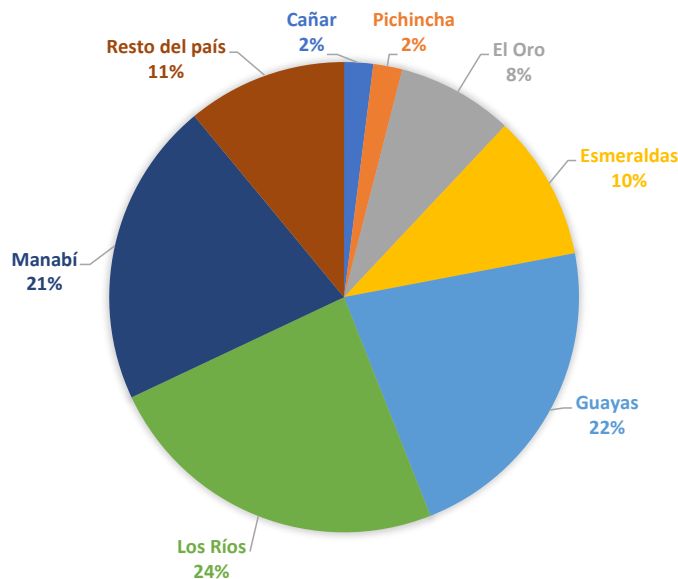


Figura 10. Producción de cacao a nivel nacional. Adaptado de: (INEC, 2002)

El 95% de la oferta mundial de cacao corresponde a la clasificación ordinaria y el restante 5% pertenece al cacao fino o de aroma (con certificación de origen). Ecuador es el principal productor de esta clasificación con 60% de producción a nivel mundial (Figura 11), seguido por Indonesia, Papau Nueva Guinea, entre otros. En Ecuador se tiene la capacidad de producir barras con cacao 100% fino de aroma, que difícilmente se puede replicar en otras partes del mundo, debido a las características geográficas y climáticas del país, lo que lo posiciona en el primer lugar en calidad de cacao (FAO, 2020).

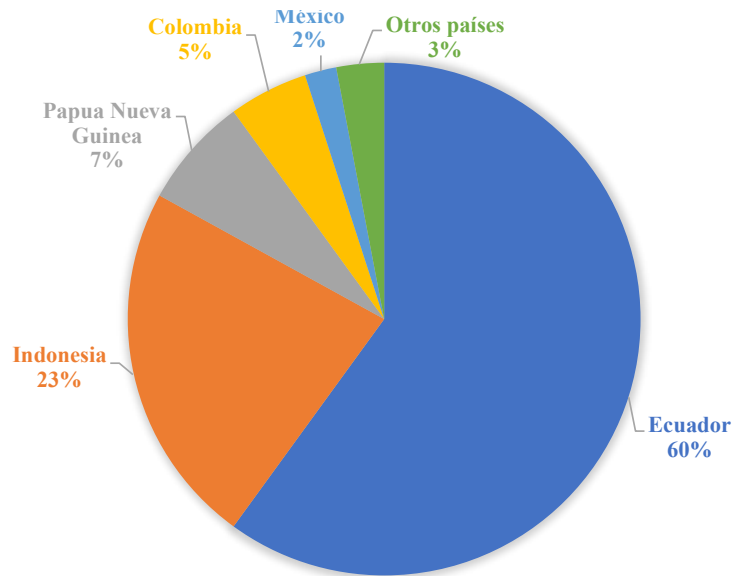


Figura 11. Producción mundial de cacao fino de aroma para el año 2011. Adaptado de: (Sánchez, 2013).

Según la Organización Internacional de Cacao (2016) en Ecuador la variedad de cacao nacional *fino de aroma* representa el 75% de la producción nacional y la diferencia corresponde a las variedades ordinarias. Además, se tiene la variedad conocida como CCN-51 (Colección Castro Naranjal – 51) por el agrónomo Homero Castro, quien después de varias investigaciones obtuvo el tipo 51 en 1965, una variedad de alta productividad, calidad y tolerante a las enfermedades (Sánchez, 2013).

2.1.3. Procesamiento industrial de los granos de cacao

El proceso de elaboración de chocolate varía dependiendo de los gustos y preferencias del consumidor y las prácticas de la empresa fabricante, sin embargo, las etapas más importantes presentes en cualquier proceso son el refinado, conchado y temperado, siendo este último uno de los que más se han investigado debido al impacto que tiene tanto en las características organolépticas como en la percepción final del consumidor (Hartel et al., 2018).

En la Figura 2 se presenta el proceso industrial de elaboración del chocolate.

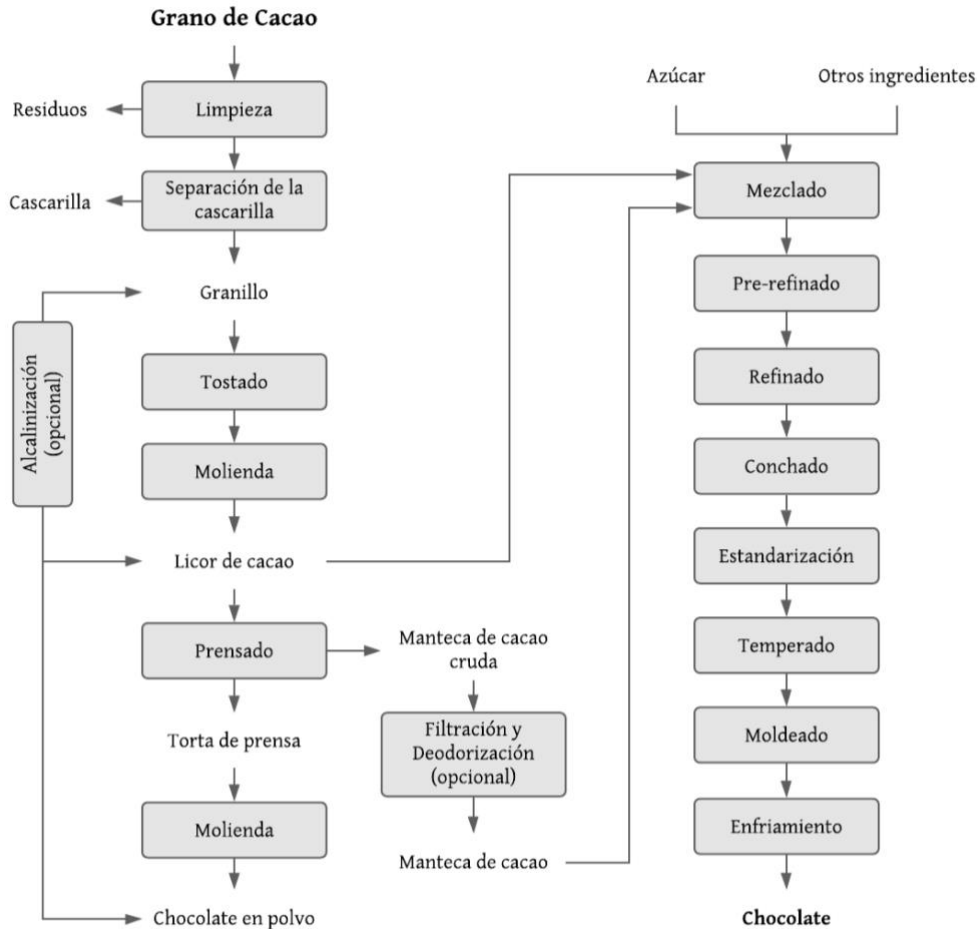


Figura 12. Proceso industrial de elaboración de chocolate. Adaptado de: (Hartel et al., 2018).

a) Limpieza

En la etapa de limpieza se elimina tierra, piedras, cuerdas, vidrio y metal; además del material relacionado con el grano de cacao que incluye la cascarilla de cacao, los granos planos y los racimos de granos. Todo este material debe eliminarse para evitar los sabores y la contaminación en el chocolate (Perez Lara & Cornejo Z., 2009).

b) Trituración

Una vez limpios, los granos son triturados, partiéndose en pedazos más pequeños. Los granos de cacao son de un tamaño similar a una almendra y también tienen una ligera cascarilla. Por ello, una vez trituradas se separa la cascarilla a través de aspiradores (Yi Chang, 2017).



c) Tostado

El tostado es un proceso que desarrolla el color, el aroma y el sabor del producto final, pues es aquí donde el grano de cacao desarrolla más de 400 aromas. La temperatura de tostado oscila entre 120 y 150 °C durante un tiempo variable que puede llegar a 25 minutos. Los granos sin tostar generalmente tienen un sabor muy astringente y amargo. Las altas temperaturas y el secado durante el tostado eliminan muchos de los ácidos volátiles, especialmente el ácido etanoico, y hacen que los granos, tengan un sabor menos ácido (Herreño & Serrano, 2014).

d) Molienda

En esta etapa, los granos de cacao son molidos varias veces para eliminar la cáscara y quedar suficientemente finos, la presión y la fricción producen una mezcla líquida, pero espesa de textura suave que es la pasta de cacao que servirá, bien para fabricar chocolate, o para hacer cacao en polvo (Oliveras, 2007).

e) Alcalinización

El proceso de alcalinización es opcional y se aplica para modificar el sabor y el color de los licores de chocolate y los polvos de cacao. Es también conocido como *procesamiento holandés* y consiste en mezclar el material de cacao seleccionado con una solución acuosa de un compuesto alcalino como carbonato de potasio, carbonato de calcio o hidróxido de sodio (International Cocoa Organization, 2016).

f) Mezclado

El mezclado de ingredientes a utilizar durante la fabricación del chocolate es una operación fundamental empleada usando combinaciones tiempo-temperatura en mezcladores continuos o discontinuos para obtener una consistencia de formulación constante (M. Díaz, 2017).

g) Refinado

El propósito del proceso de refinado es permitir reducir el tamaño de las partículas individuales no grasas, de manera que no sean perceptibles a la lengua o el paladar y aceptable en la confitería moderna de chocolate (Afoakwa, 2010). Estas partículas deben ser menores de $30\ \mu\text{m}$, por lo que a nivel industrial se suele usar un refinador de cinco rodillos (Figura 13) (Yi Chang, 2017).

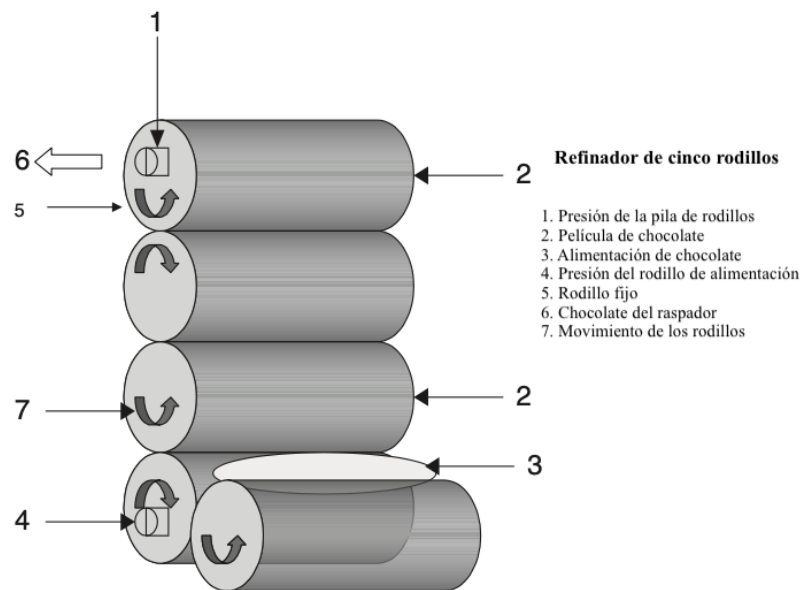


Figura 13. Diagrama esquemático de un refinador de cinco rodillos. Adaptado de: (Afoakwa, 2010).

h) Conchado

El conchado es considerado como la operación final en la fabricación de chocolate a granel, ya sea leche u oscuro. Es un proceso esencial que contribuye al desarrollo de viscosidad, textura final y sabor. La etapa de conchado se realiza en cajones o tambores que cuentan con rodillos que amasan la pasta con un lento movimiento de vaivén (Figura 14); dependiendo del producto que se quiera adquirir, varía el tiempo y la temperatura (Beckett, 2008).

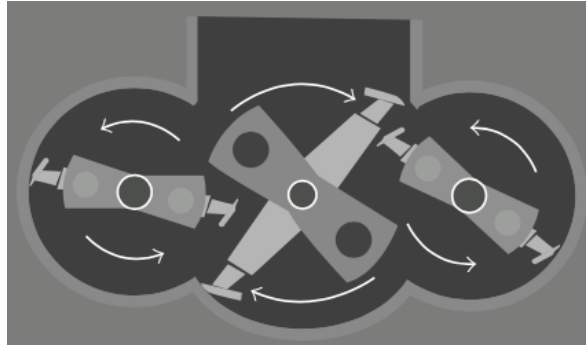


Figura 14. Ilustración de la mecánica interna de un equipo de conchado. Fuente: (Afoakwa, 2010).

i) Temperado

El temperado es una técnica de pre-cristalización controlada que se utiliza para inducir la formación de una forma más termodinámicamente estable de la manteca de cacao (Figura 15) con el fin de brindar buenas características de rompimiento, contracción y brillo (Afoakwa, 2010; Roth, 2010).

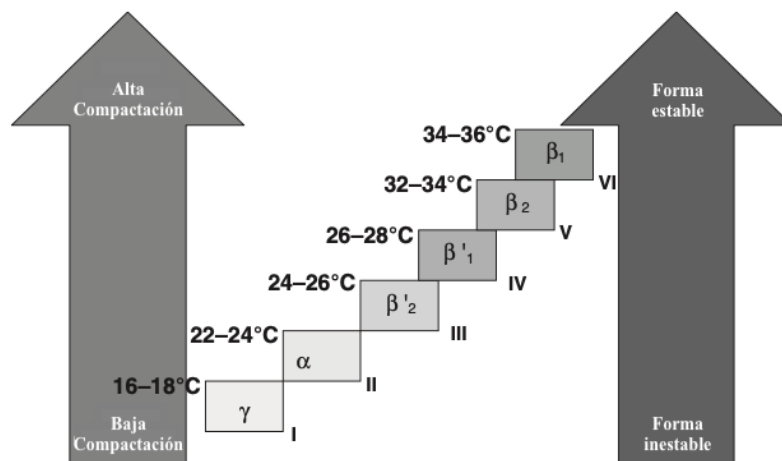


Figura 15. Regímenes de temperatura y grado de estabilidad en seis formas polimórficas de manteca de cacao. Adaptado de: (Afoakwa, 2010).

j) Moldeo y enfriamiento

En esta etapa se producen piezas sólidas de tamaños precisos. Los moldes son la parte principal de la instalación y pueden estar acoplados a estructuras portadoras a las cadenas del circuito. Los moldes utilizados para la fabricación de chocolates son actualmente de material plástico, debido a que proporcionan una mejor disposición para el brillo de la pieza, facilitan el transporte y reducen el ruido en la línea (Beckett, 2008).



2.1.1. *Industria del chocolate en el mundo*

El mercado mundial de cacao ha mostrado un crecimiento progresivo debido a la sólida trayectoria de crecimiento mundial de la industria de confitería de chocolate. Los nuevos desarrollos de productos en las industrias alimentaria, cosmética y de salud, también están incrementando el crecimiento en el mercado de cacao y chocolate. El sabor líder en nuevos lanzamientos de bebidas, panadería y artículos de confitería es el chocolate; también está emergiendo como un ingrediente saludable debido a que posee antioxidantes y minerales lo que ocasiona un aumento en la demanda de cacao y chocolate en un futuro (Fortune Business Insights, 2020).

Según analistas de la industria M&M el mercado global de chocolate generará ventas anuales de alrededor de 98,300 millones de dólares al año. Hasta el año 2017 se calculó un consumo de 7,450 toneladas al año. Suiza es el país con mayor consumo en el mundo con 11 kg per cápita, seguido por Alemania con 7.9 kg y Reino Unido con 7.5 kg de chocolate. En América Latina, Argentina y Uruguay son los principales consumidores de este producto con 3 kg per cápita (Marketing, 2019).

En cuanto a manufactura, la Unión Europea es la mayor región elaboradora de productos de cacao del mundo, seguida por Estados Unidos. Los mayores fabricantes de chocolate se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales empresas de confitería del mundo que fabrican algún tipo de chocolate, por valor neto de ventas de confitería en 2018. Adaptado de: (International Cocoa Organization, 2020).

Empresa	Ventas netas (millones de USD)
Mars Wrigley Confectionery, Mars Inc (Estados Unidos)	18
Grupo Ferrero (Luxemburgo/Italia)	13
Mondelēz International (Estados Unidos)	11,8
Meiji Co Ltd (Japón)	9,721
Hershey Co (Estados Unidos)	7,986
Nestlé SA (Suiza)	7,925
Chocoladenfabriken Lindt & Sprüngli AG (Suiza)	4,574
Pladis (Reino Unido)	4,515
Haribo GmbH & Co. K.G	3,3
Ezaki Glico Co. Ltd.	3,156



2.1.2. *Industria del chocolate en Ecuador*

Hay registros que en 1883, muy pocas personas se dedicaban a la elaboración de productos de chocolate, empleando entre 3 a 7 personas por empresa. Debido a la falta de costumbre de comer chocolate y posiblemente al calor, este negocio, especialmente en Guayaquil, no prosperaba.

Por otra parte, las ventas en 2013 de este producto alcanzaron los \$ 21.8 millones, 17 millones más que lo alcanzado hace 5 años (\$ 4.4 millones). No obstante, pese al crecimiento, su aporte en las exportaciones no petroleras se ubica en tan solo 0.20 %.

En el país existen aproximadamente 10 empresas grandes que se dedican a la producción de torta, licor, manteca, polvo y elaborados de cacao, las mismas que destinan sus productos mayoritariamente al mercado internacional. Mientras que, las industrias medianas y pequeñas se dedican a producir chocolates, caramelos y bombones.

Las industrias más conocidas se encuentran en Guayaquil y Quito, entre las cuales se tiene: BIOS, La Perla, Casita de Chocolate, Cocoa Chocolatier, Chocolateca, Chocobreak, Rualdos, Merelitt, SKS Farms, Gustaff, Choko Dell. Las firmas Incacao, Edeca, Colcacao son de mayor tamaño y se ubican en la provincia del Guayas (Rodríguez & González, 2012).

Por otra parte, las principales industrias son: La Universal S.A., Nestlé Ecuador S.A., Transmar Ecuador, Ecuacoffee S.A., Ecuacocoa, Indexa, Casa Luker del Ecuador, Triairi S.A., Askley Delgado, Plustelco, Tulicorp, Corporación Grupo Salinas y FEPP (Rodríguez & González, 2012).

Varias marcas como Pacari, Hoja Verde, Kallari, Choco Art y Ecuartesanal han trabajado en una oferta gourmet que además emplea distintas especias como ají, hierbaluisa, jengibre, mortiño, uvilla; otros confites mezclan sabores con frutas tropicales como maracuyá, piña o mango (Anecacao, 2020).

2.1.3. *Industria del chocolate en Asturias – España*

El chocolate llegó a España en el siglo XVI y en sus inicios era considerado un alimento de lujo para clérigos y clases sociales altas. En la actualidad, en el país se tiene un consumo de 5.23 kg per cápita (Produlce, 2019) y se posicionó como uno de los principales países importadores de cacao en grano, con 101,667 miles de toneladas (Figura 16).

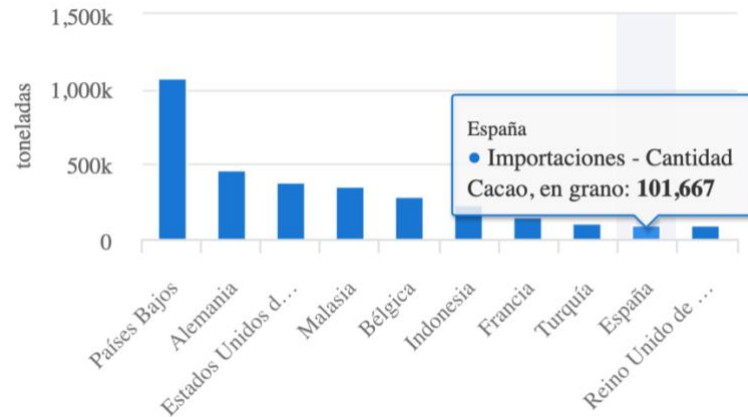


Figura 16. Principales países importadores de cacao en grano en 2019. Fuente: (FAOSTAT, 2020a).

La categoría de cacao y chocolate aumentó en 2017 su producción en volumen en 0.6% hasta las 285,103 toneladas métricas y un 1.1% en valor, alcanzando los 1,749 millones de euros según datos de Produlce, pero al comparar la producción de chocolate y derivados con la de otros países, España se encuentra por encima de Austria, Bélgica o Dinamarca, por debajo de Francia o Italia y muy por debajo de Alemania y Reino Unido (Borrallo, 2019).

En la Figura 17, se registran los datos en volumen (toneladas métricas) de la industria del chocolate en España en el año 2017.

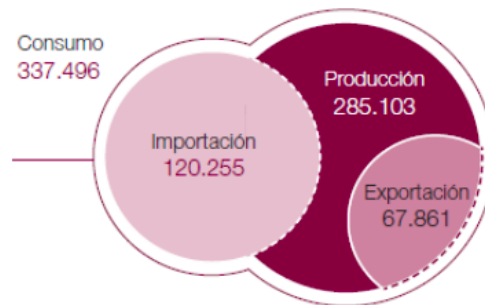


Figura 17. Industria de chocolate en España. Fuente: (Produlce, 2019).

Concretamente, en Asturias no es sino hasta 1853 cuando comienza a elaborarse el chocolate en *La Perla Americana* de Oviedo y se llegó a contar con 302 fábricas de chocolate, pero esta industria entra en declive como consecuencia de la postguerra.

Actualmente, la única fábrica chocolatera que se encuentra en Asturias está situada en Meres (Siero) y es *Chocolates del Norte S.A.* que pertenece al grupo de chocolates *Lacasa*. Esta industria se creó en el año 1984 para la fabricación de productos derivados

del cacao (productos de chocolate) como: chocolatinas (11 millones de unidades por año) y paraguas de chocolate (12 millones de unidades por año). Actualmente exporta a países de Europa, África, Latinoamérica y Asia (Borrallo, 2019).

2.1.4. Cascarilla de cacao

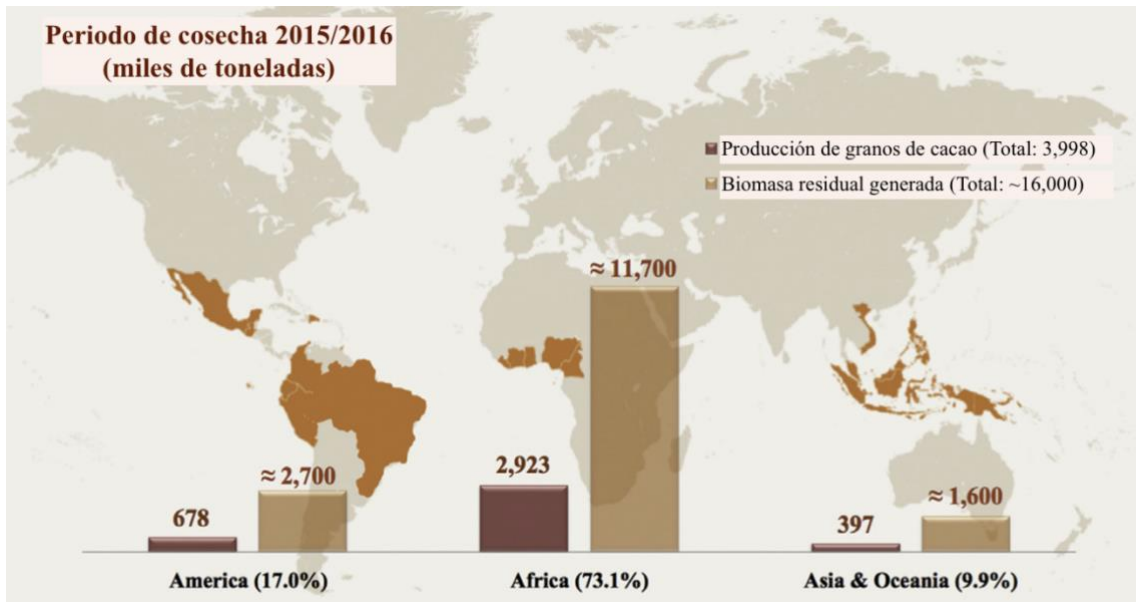





Figura 18. Producción de cacao en grano y generación de biomasa residual. Fuente: (Vásquez et al., 2019).

La biomasa residual generada por la industrialización del cacao es aproximadamente cuatro veces más que la producción de cacao en grano para el periodo de cosecha 2015/2016 según Vásquez et al. (2019)(Figura 18). Estos residuos de la industria de cacao – chocolate son la cáscara o vaina, mucílago y cascarilla.

De acuerdo con el procesamiento que se le da a esta biomasa se pueden obtener varios productos de interés industrial como los enlistados en la tabla 4.

Tabla 4. Principales productos y biocomponentes obtenidos de la biomasa residual del cacao. Adaptado de: (Vásquez et al., 2019).

Extracción Química	<ul style="list-style-type: none"> • Extractos con actividad antimicrobiana y antiglicosil-transferasa. • Precursor de los monolitos de carbono sin aglutinantes. • Fibra dietética • Extractos para aplicaciones dentales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibra dietética 	<ul style="list-style-type: none"> • Gel en forma de pectina altamente acetilado. • Fibra dietética con actividad antioxidante. • Fertilizante potásico • Captador antiviral, antibacteriano y de radicales. • Extractos con potencial antioxidante. • Adsorbente para descontaminación ambiental. • Teobromina y cafeína
Biomasa Residual	 <p>Cascaquilla de cacao residual</p>	 <p>Pulpa de cacao fermentada residual</p>	 <p>Vaina de cacao residual</p>
Bioconversión	<ul style="list-style-type: none"> • Lipasas • Vino de cacao • Vino de frutas • Bebidas de cacao • Bebidas alcohólicas • Piensos para ganado • Goma Xantana • Fructosiltransferasa 		

En el caso concreto de la cascaquilla se pueden calcular en aproximadamente 700 mil toneladas al año (International Cocoa Organization, 2016). La cascaquilla de cacao se retira del grano antes o después de tostar las semillas y es considerada un subproducto de la industria del cacao que generalmente se subutiliza o se desecha como desperdicio (Okiyama et al., 2017). Se estima que la cascaquilla representa aproximadamente el 12% del volumen total de pasta de cacao generada por día de producción en una industria chocolatera (Falesi et al., 2018).

La composición de la cascaquilla de cacao es bastante variable, al igual que la de los granos de cacao, y dependerá de su origen y del procesamiento al que se haya sometido, entre otros factores. La Tabla 5 resume la composición química de la cascaquilla.

**Tabla 5.** Composición química de la cascarilla de cacao. Adaptado de: (Vásquez et al., 2019).

Compuesto	Valor (% residuo seco)
Carbohidratos	17.8 - 23.17
Celulosa	15.1
Lignina	32.41
Proteínas totales	15.79 - 18.1
Lípidos	2.02 - 6.87
Pectina	4.7 - 6.0
Cenizas	5.96 - 11.42
Fibra dietética total	18.6 - 60.6
Teobromina	1.3
Cafeína	0.1
Fenoles totales*	1.32 - 5.78
Antocianinas**	0.4
Taninos	3.3 - 4.46
Flavonoles	1.5

* (g Ácido Gálico Equivalente/100g).

** (μg quercetina/100g de cascarilla de cacao).

2.1.5. Economía circular en la gestión de cascarilla de cacao

El concepto de Economía Circular ha surgido en la última década como alternativa al modelo clásico de economía lineal (de la cuna a la tumba) basado en la idea de usar y desechar, al modelo de economía circular (de la cuna a la cuna) que implica reducir, reutilizar y reciclar. Este modelo tiene como objetivo mantener los productos, componentes y materiales en su mayor utilidad y valor, es decir, tiene la intención de convertir un residuo en un recurso para ser utilizado como materia prima en posteriores procesos, de esta manera se cierra el ciclo y se extiende su vida útil el mayor tiempo posible (Figura 19) (Moreno, 2020).

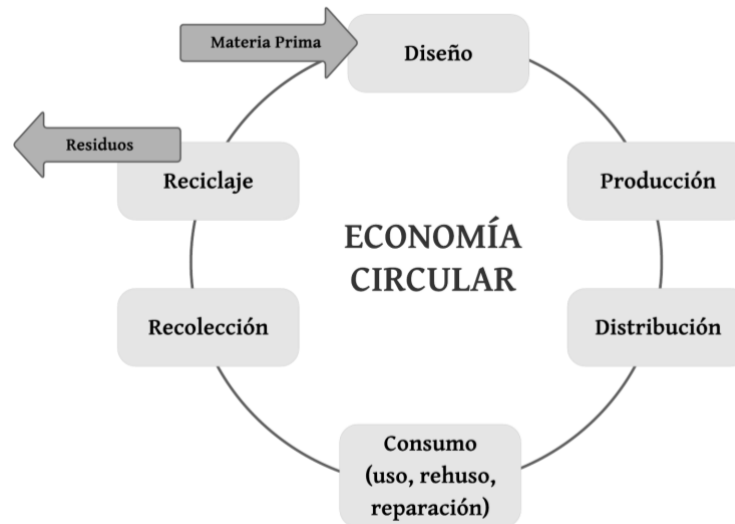


Figura 19. Esquema del concepto de Economía Circular. Adaptado de: (Moreno, 2020).

En el contexto de economía circular, la cascarilla de cacao ha cobrado un resiente interés biotecnológico debido a su alto valor nutricional ocasionado por la presencia de una variedad de biocompuestos, como compuestos fenólicos, fibras dietéticas, teobromina y un perfil lipídico similar al de la manteca de cacao, además de su color y sabor a chocolate (Okiyama et al., 2017). Por esta razón, la cascarilla de cacao se puede transformar en piensos, potasa para la fabricación de jabón blando, abono orgánico y fertilizantes orgánicos (Adomako, 2006). Además existen estudios que utilizan este residuo como materia prima para la obtención de carbón activado (Vásquez et al., 2019), sustrato en diferentes bioprocesos (Nazir et al., 2016), suplemento alimenticio por su alto contenido de fibra (Terán, 2019), producción de biocombustibles, entre otros.

Por otra parte, Amim & Yee (2006) determinaron los efectos antioxidantes de los extractos de cascarilla de cacao. Compararon el extracto liofilizado etanólico de la cascarilla con antioxidantes sintéticos (BHT y β -tocoferol) sobre la oxidación de lípidos de la carne de res cocida almacenada a 4 °C hasta 14 días. En este estudio, la oxidación de lípidos fue significativamente menor en la carne de res cocida que contenía extracto de cáscara de cacao en comparación con los antioxidantes sintéticos, y fue posible inferir que los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de cascarilla de cacao pueden reducir potencialmente la oxidación de lípidos de cocido-refrigerado vacuno, además de presentar una excelente estabilidad oxidativa (Okiyama et al., 2017).

2.2. Tratamientos de Hidrólisis

Los residuos agroalimentarios consisten mayoritariamente en una biomasa lignocelulósica de origen vegetal que está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina; esta es la razón por la que se dificulta el aprovechamiento de estos residuos, debido a la estructura compleja que esta composición le confiere, ya que no puede ser degradada fácilmente por los microorganismos. Para obtener los azúcares de estos residuos se hidrolizan los polisacáridos a monómeros, lo que hace necesario llevar a cabo un proceso de pretratamiento. El objetivo de los pretratamientos químicos, físicos y biológicos empleados en los procesos de hidrólisis es aumentar la porosidad, reducir el grado de polimerización de la biomasa, intentar eliminar la lignina y reducir el grado de polimerización de la celulosa para obtener azúcares solubles que puedan ser usados como sustrato en procesos fermentativos y otros procesos para el aprovechamiento de residuos agroalimentarios como la cascarilla de cacao (Morales De La Rosa, 2015). Los principales productos de degradación durante el proceso de hidrólisis de residuos lignocelulósicos se representan esquemáticamente en la Figura 20.

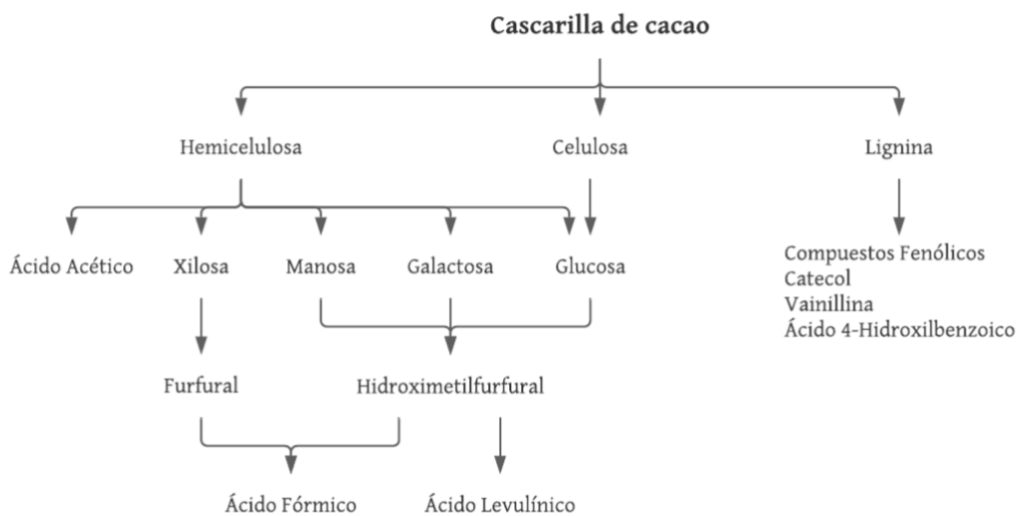


Figura 20. Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Adaptado de: (Igbinalodor & Onilude, 2013).

2.2.1. Hidrólisis Hidrotérmica

Esta hidrólisis consiste en mezclar el residuo de partida a una relación determinada con agua. Esta mezcla es sometida a elevadas temperaturas (superiores a 100 °C) y generalmente se emplea también cierta presión (mayor a 0.101 MPa), durante un tiempo determinado. Las condiciones de temperatura, tiempo y presión al igual que la relación



materia seca/agua establecen el grado de degradación final. Es un modelo de hidrólisis que presenta grandes ventajas como la generación de cantidades muy bajas o nulas de subproductos inhibidores (HMF, furfural, ácido acético), disminución del impacto ambiental, pH moderados que producen menos daños en los equipos y buen rendimiento del proceso (A. Díaz, 2015).

2.2.2. Hidrólisis Ácido-térmica o alcalino-térmica

Estos procesos de hidrólisis consisten en la aplicación de un ácido o una base diluidos con la muestra para someterla a un tratamiento térmico durante un determinado periodo de tiempo. Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico. Entre las bases que más se emplean se encuentran los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio. Se requieren temperaturas relativamente elevadas debido a que el ácido o la base están diluidos, para conseguir un rendimiento aceptable. A condiciones altas de temperatura se pueden degradar los glúcidos y también generar compuestos que inhiben el proceso de fermentación e incrementan la corrosión de los equipos (Kootstra et al., 2009).

2.3. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias con la capacidad de retardar o prevenir la oxidación y están relacionados positivamente con varias enfermedades crónicas degenerativas como: enfermedades cardiovasculares, del sistema inmune, neurodegenerativas como el Alzheimer, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca congestiva, cáncer, cataratas, entre otras.

Para seguir un estilo de vida saludable como prevención de muchas enfermedades, el contenido de antioxidantes en una dieta debe considerarse como uno de los principales criterios. Además, los antioxidantes también juegan un papel importante en la vida útil de los alimentos. Por ejemplo, inhiben o previenen la oxidación de lípidos, lo que da como resultado la formación de compuestos aromáticos indeseables y protegen componentes alimenticios valiosos como proteínas y vitaminas (Mareček et al., 2017).

Los antioxidantes tienen varios sistemas de acción (Criado & Moya, 2009):

1. Mecanismo de prevención: impiden la formación de radicales libres o especies reactivas.
2. Mecanismo de reparación: favorecen la reparación de las estructuras dañadas biológicamente.
3. Mecanismo barredor: inhiben la acción de los radicales libres (Figura 21).

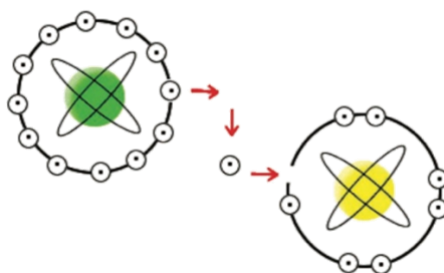


Figura 21. Neutralización de un radical libre por un antioxidante. Fuente: (Criado & Moya, 2009).

2.3.1. Clasificación

Los antioxidantes se clasifican en endógenos, es decir, son fabricados por la propia célula, y exógenos, si ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de los Antioxidantes. Fuente: (Criado & Moya, 2009).

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas: Superóxidodismutasa (SOD) Catalasa Glutación peroxidasa	Hierro
Licopeno		Selenio

Los minerales cobre, selenio, manganeso y zinc actúan como cofactores regulando la actividad antioxidante de las enzimas, mientras que, la actividad antioxidante de las vitaminas se basa en su capacidad de ceder o aceptar electrones de los radicales libres.



2.3.2. *Capacidad Antioxidante y su determinación*

La capacidad antioxidante es un parámetro que cuantifica una respuesta global de un antioxidante frente a un agente oxidativo (Criado & Moya, 2009).

Debido a que la capacidad antioxidante total de una muestra está determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos y por el modo de acción concreto de cada uno de ellos, durante los últimos años se han desarrollado varios métodos para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos basados en distintos aspectos como: la capacidad de captación de radicales peroxilo (ORAC, TRAP), la reducción de metales (FRAP), de radicales hidroxilo (ensayo de la desoxirribosa), de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH), en la cuantificación de productos generados durante la peroxidación lipídica (TBARs, oxidación de LDLs), entre otros (Heras, 2015).

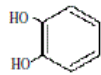
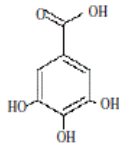
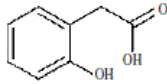
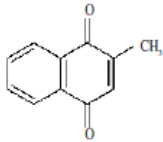
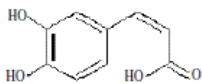
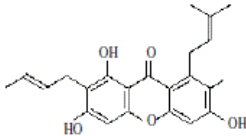
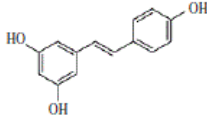
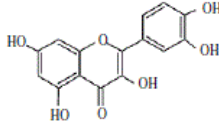
La capacidad antioxidante no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes sino también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto (Kuskoski et al., 2005).

2.3.3. *Compuestos fenólicos*

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas, caracterizados como compuestos aromáticos que tienen grupos hidroxilo como sustituyentes y debido a su actividad antioxidante, pueden proteger los componentes celulares del daño oxidativo y, en consecuencia, pueden limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo. Además, poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplástica (Kuskoski et al., 2005).

La clasificación general de los compuestos fenólicos se muestra en la Tabla 7. Estos compuestos son un grupo cercano a 8,000 sustancias que se pueden clasificar de acuerdo con su estructura, entre los cuales, los más importantes son los flavonoides, que poseen una estructura básica C₆-C₃-C₆, como las antocianinas, catequinas y epicatequinas. El subgrupo de los fenilpropanoides incluye los derivados del ácido hidroxicinámico, como cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico; estilbenoides, como el resveratrol y derivados del ácido benzoico, como el gálico y algunos ácidos elágicos, entre otros (Márquez et al., 2014).

Tabla 7. Clasificación de los compuestos polifenólicos. Fuente: (Mercado-Mercado et al., 2013).

Clase	Estructura	Ejemplo	Clase	Estructura	Ejemplo
Fenoles simples	C_6	 Catecol	Ácidos hidroxibenzoicos	C_6-C_1	 Ácido gálico
Ácidos fenilacéticos	C_6-C_2	 Ácido 2-hidroxi-fenilacético	Naftoquinonas	C_6-C_4	 Menadiona
Ácidos hidroxicinámicos	C_6-C_3	 Ácido caféico	Xantomas	$C_6-C_7-C_6$	 Mangostina
Estibenos	$C_6-C_2-C_6$	 Resveratrol	Flavonoides	$(C_6-C_3-C_6)$	 Quercetina

De los productos y subproductos obtenidos del cacao, la cascarilla de cacao muestra una gran cantidad de compuestos fenólicos y ha demostrado ser una fuente buena y económica de estos biocompuestos con un importante efecto antioxidante (Okiyama et al., 2017).

2.3.4. Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales mediante el ensayo de reactivo de Folin-Ciocalteu se basa en la transferencia de electrones e involucra la reducibilidad de fenoles en solución alcalina con pH de 10. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en medio ácido) es de color amarillo y al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo azul intenso, que se puede medir a 700 – 760 nm. Este ensayo es simple, conveniente y ha producido una gran cantidad de datos comparables, es por esto que se ha convertido en un ensayo de rutina para estudiar los antioxidantes fenólicos de frutas, verduras y plantas medicinales (Xu et al., 2017).

3. METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos propuestos en este Trabajo de Titulación se ha empleado como material para la realización de los ensayos cascarilla de cacao suministrada por la industria *Chocolates del Norte S.A. (Grupo Lacasa)* de Asturias – España.

Los experimentos realizados, así como los análisis de las muestras, fueron llevados a cabo por triplicado y se efectuaron en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo, en Asturias – España.

A continuación, se detalla la metodología, materiales y equipos utilizados a lo largo de este proyecto.

3.1. Diagrama de flujo de proceso

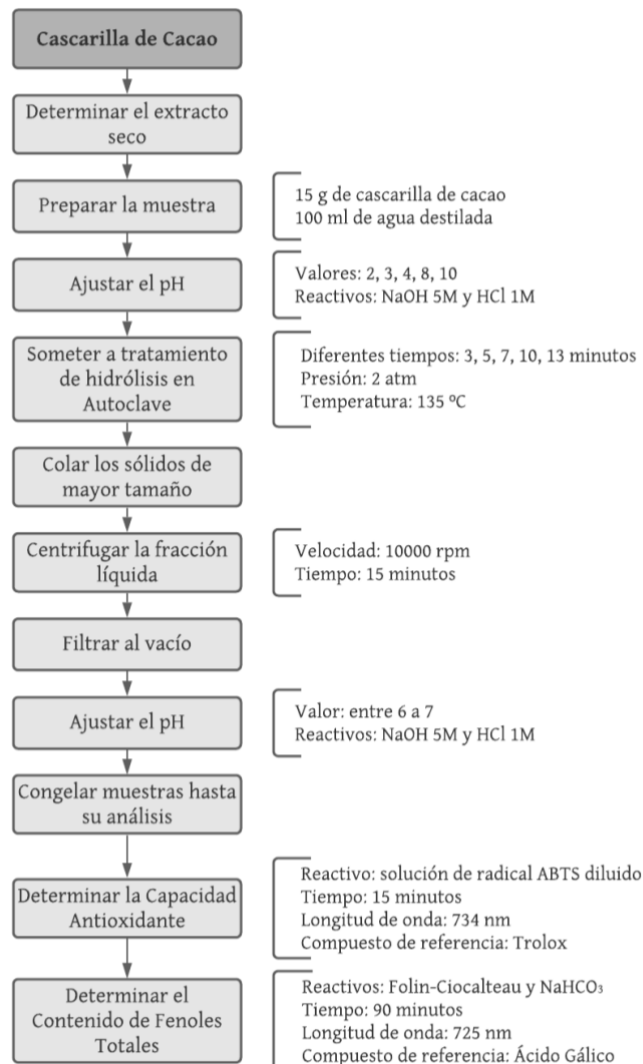


Figura 22. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.

3.2. Esquema de los procesos de cuantificación realizados

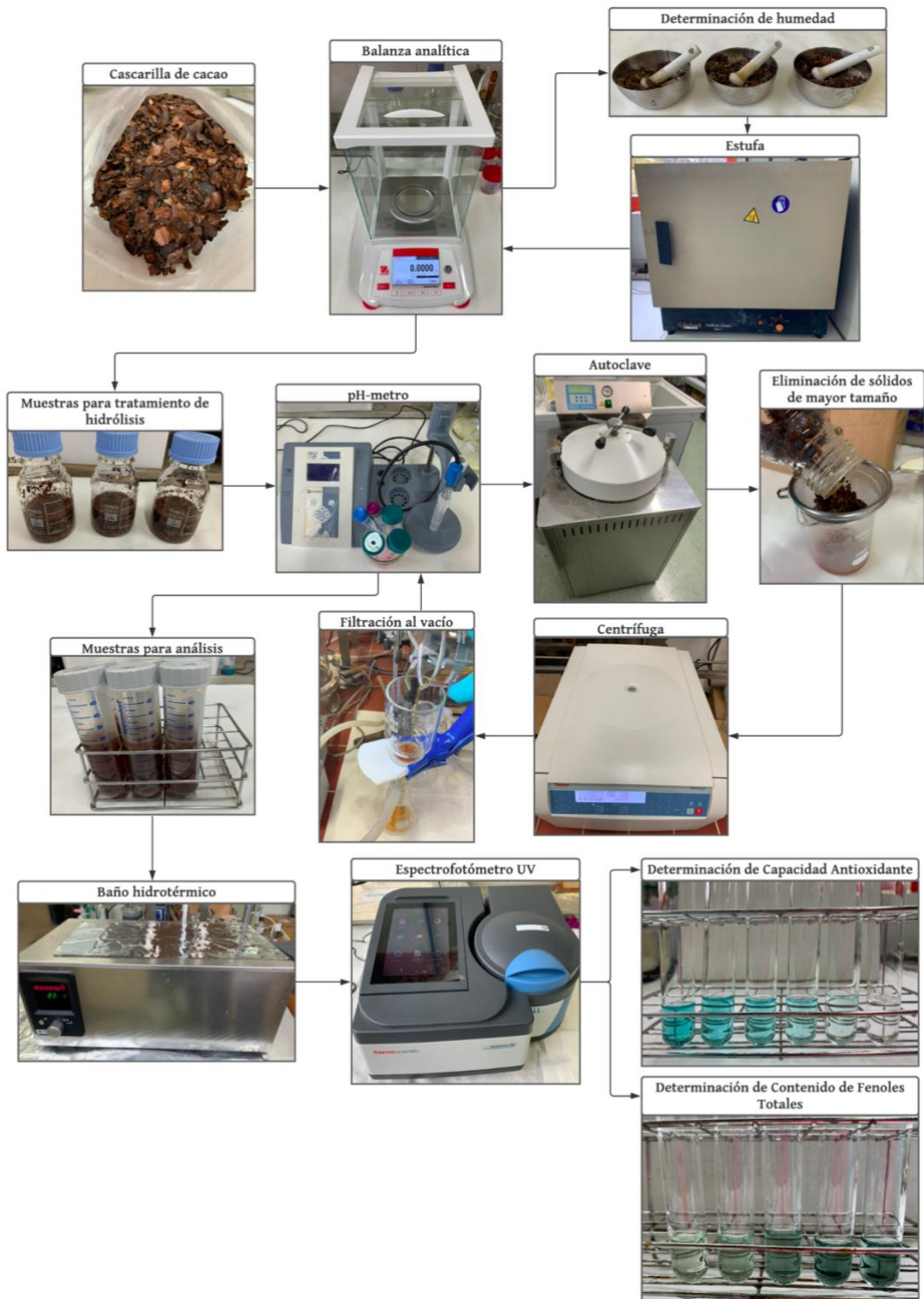


Figura 23. Esquema de los procesos realizados.

3.3. Determinación del extracto seco de la muestra

Para establecer el extracto seco de la cascarilla de cacao se midió la humedad de la muestra de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- i. Se añadió arena de mar lavada (Panreac) a cápsulas de acero inoxidable hasta completar aproximadamente la mitad de su volumen.
- ii. Se introdujo en una estufa (Gallenkamp Hotbox Oven, Size 1) (Figura 24) a 105 °C las cápsulas con la arena y un mortero, durante al menos media hora.
- iii. Pasado este tiempo, se sacaron las muestras y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador.
- iv. Una vez frías, se pesaron las cápsulas con la arena y el mortero en una balanza analítica (Adventurer Analytical Electronic Balance, AX224 - OHAUS) (Figura 25), obteniendo de este modo (M_0).
- v. Se añadió a cada cápsula entre 3 o 4 g de cascarilla de cacao y se anotó este peso (M_1).
- vi. A continuación, se trituró la cascarilla con la ayuda del mortero y la arena, después se colocaron las cápsulas nuevamente en la estufa a 105 °C durante al menos 5 horas.
- vii. Tras este tiempo, se sacaron las cápsulas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador y después se realizaron varios pesajes hasta obtener un valor constante. Se tomó el último valor que corresponde a (M_2).



Figura 24. Estufa Gallenkamp Hotbox Oven, Size 1.

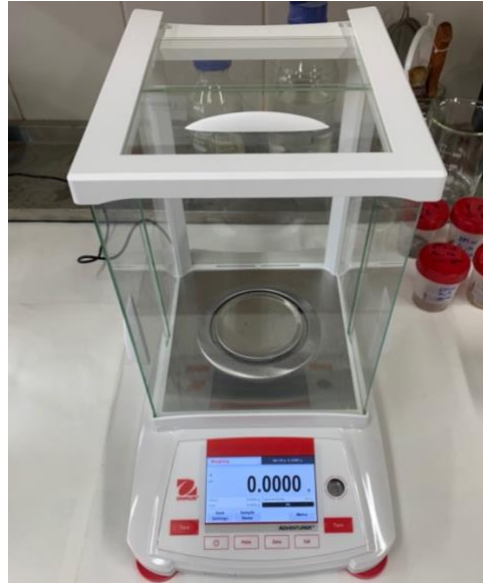


Figura 25. Balanza analítica Adventurer Analytical Electronic Balance, AX224 – OHAUS.

Para obtener el porcentaje de humedad de la muestra se utiliza la ecuación 1:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} * 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

De tal manera que para determinar el extracto seco de la cascarilla de cacao se emplea este resultado en la ecuación 2:

$$\% \text{ Residuo seco} = 100 - \% \text{ Humedad} \quad \text{Ecuación 2.}$$

3.4. Extracción de compuestos solubles en agua

Para caracterizar la cascarilla de cacao sin tratar, se realizó la extracción de los compuestos solubles de este residuo. Para ello se mezcló la muestra con agua destilada en una proporción de 15% (p/v), es decir, se colocaron 15 g de cascarilla de cacao en botellas Pyrex de 250 mL con 100 mL de agua destilada y se ajustó el pH a diferentes valores. Se dejó reposar la muestra durante una hora y después se eliminaron los sólidos de mayor tamaño con un colador. A continuación, se centrifugó la fracción líquida durante 15 minutos a 10000 rpm en una centrífuga (Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific) (Figura 26). El sobrenadante obtenido se filtró al vacío con un papel filtro de aproximadamente 20 μm de tamaño de poro para eliminar los sólidos suspendidos. Finalmente, se ajustó el pH a valores de 6 o 7 mediante NaOH

(Sigma-Aldrich) 5M y HCl (Sigma-Aldrich) 1M empleando un pH-metro (Basic 20+, Crison Instruments) (Figura 27) y se congelaron las muestras hasta su análisis.



Figura 26. Centrífuga Heraeus Multifuge X1 Centrifuge Series, Thermo Fisher Scientific.



Figura 27. pH-metro Basic 20+, Crison Instruments.

3.5. Tratamientos de Hidrólisis

Se llevaron a cabo distintos tratamientos de hidrólisis con el fin de determinar cuál resulta más adecuado para obtener la mayor capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales posibles. Cada proceso de hidrólisis se realizó por triplicado con el propósito de tener en cuenta las posibles variaciones de la muestra de cascarilla de cacao.

3.5.1. *Hidrólisis Hidrotérmica*

Se realizaron cinco hidrólisis hidrotérmicas a distintos tiempos, con una temperatura de 135 °C y presión de 2 atm (condiciones de trabajo preestablecidas por el equipo de investigación), utilizando un autoclave (AES 75, Raypa) (Figura 28).



Figura 28. Autoclave AES 75, Raypa.

Las muestras fueron preparadas siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.4. y se realizaron las distintas hidrólisis durante 3, 5, 7, 10 y 13 minutos. Una vez finalizado el tratamiento, se dejaron enfriar las botellas a temperatura ambiente y de igual manera se eliminaron los sólidos de mayor tamaño con un colador. A continuación, para eliminar los sólidos suspendidos, la fracción líquida se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró al vacío con un papel filtro de ~ 20 μm de tamaño de poro. Finalmente, se ajustó el pH a valores de 6 o 7 mediante NaOH 5M y HCl 1M y se congelaron las muestras hasta su análisis.

3.5.2. *Hidrólisis Ácido-Térmica*

Este proceso se realizó de manera similar que, en el apartado anterior, se mezcló la muestra con agua destilada en una proporción de 15% (p/v) y se ajustó el pH a valores de 2, 3 y 4 con ácido clorhídrico 1M. Después se llevó al autoclave por diferentes tiempos de 3, 5, 7, 10 y 13 minutos a 135 °C y 2 atm de presión.

Tras la hidrólisis y una vez frías las botellas, se eliminaron los sólidos de mayor tamaño con un colador, se centrifugó a la parte líquida a 10000 rpm por 15 minutos y se



filtró al vacío para eliminar los sólidos en suspensión. De igual manera que en los apartados anteriores, se ajustó el pH entre 6 – 7 y se congelaron las muestras hasta su análisis.

3.5.3. *Hidrólisis Alcalino-Térmica*

Para llevar a cabo la hidrólisis alcalino-térmica se utilizó NaOH 5M para ajustar el pH a valores de 8 y 10. Se utilizó la misma relación 15% p/v para mezclar cascarilla de cacao y el agua destilada. Las muestras se prepararon en botellas Pyrex de 250 mL y se introdujeron en el autoclave a 135 °C durante los diferentes tiempos antes mencionados.

A partir de este punto se llevó a cabo el mismo procedimiento que en los casos anteriores.

3.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante

Para el análisis de la capacidad antioxidante del hidrolizado de cascarilla de cacao se siguió el método espectrofotométrico del radical ABTS[•] descrito por Márquez et al. (2014) y Quan et al. (2020) con algunas modificaciones.

El procedimiento empleado se describe a continuación:

- i. Se añadieron 5 ml de ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma) 7 mM con 88 μ L de K₂S₂O₈ (Sigma – Aldrich) 140 mM y se dejó en agitación durante 12 a 16 horas en oscuridad y a temperatura ambiente, para obtener la solución de ABTS[•].
- ii. Se diluyó la solución de ABTS[•] con etanol (VWR) hasta un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.02 a 734 nm.
- iii. Se añadieron 3.9 mL de solución ABTS[•] diluido a 100 μ L de muestra en tubos cubiertos con papel aluminio. Para el blanco se utilizaron 100 μ L de etanol en lugar de la muestra.
- iv. Se incubaron los tubos en un baño hidrotérmico (MEMMERT Type: WNB 10) (Figura 29) a 25 °C durante 15 minutos.
- v. Tras los 15 minutos, se midió la absorbancia del blanco y de las muestras en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Helios Alpha) (Figura 30) a 734 nm.

El compuesto de referencia empleado fue Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic Acid) (Sigma – Aldrich) en concentraciones de 0 a 250 ppm en etanol.

La capacidad antioxidante se expresó en miligramos de Trolox equivalente por gramo de muestra seca, utilizando la ecuación 3.

$$\frac{mg TE}{g residuo seco} = \frac{Abs * F}{R * 1000} * \frac{1 \text{ litro}}{1000} * \frac{V_{H_2O}}{P_0} * \frac{100 g de muestra}{X g de residuo seco} * 1000$$

Ecuación 3.

Donde:

Abs → Absorbancia medida en cada muestra.

F → Factor de dilución empleado en cada caso.

R → pendiente de la recta de calibrado, en la cual en el eje X se representa la concentración de Trolox en ppm y en el eje Y la absorbancia.

V_{H₂O} → volumen de agua utilizada para la hidrólisis.

P₀ → Peso inicial de cascarilla de cacao (15 g).

X → Porcentaje de residuo seco de cascarilla de cacao.

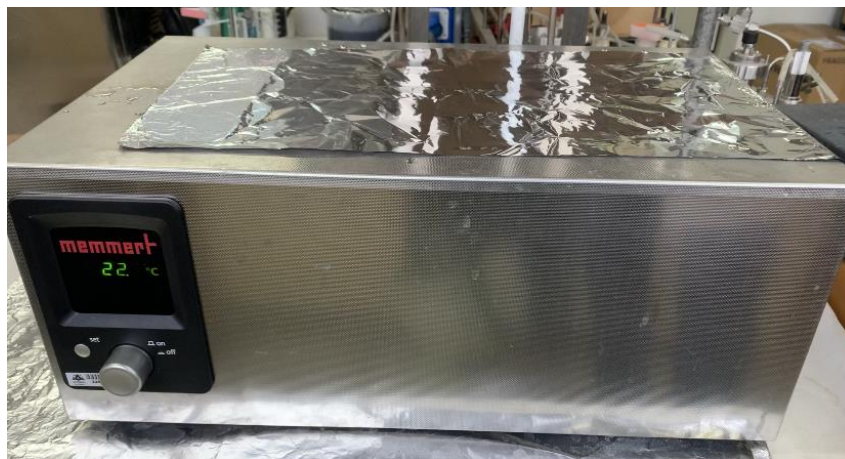


Figura 29. Baño hidrotérmico MEMMERT Type: WNB 10.



Figura 30. Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios Alpha.

En este método, a mayor concentración de un compuesto con capacidad antioxidante, mayor será la pérdida de color visible en el experimento. Este comportamiento se muestra en la Figura 31, en donde se tienen diferentes concentraciones del compuesto de referencia (Trolox) y se observa la pérdida de color conforme aumenta la concentración de Trolox.

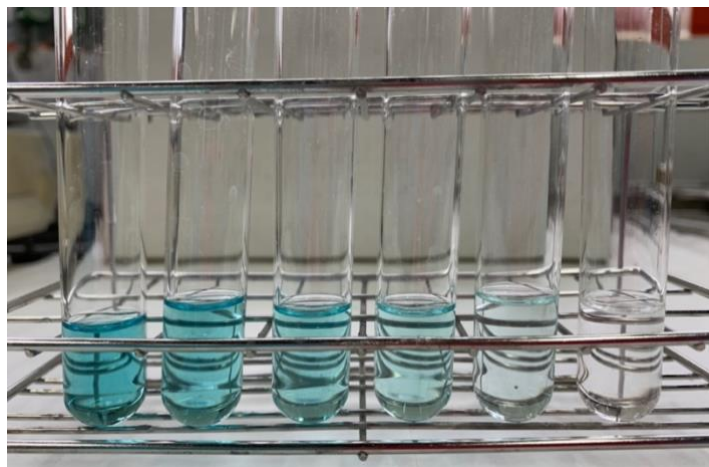


Figura 31. Patrones de Trolox para realizar la recta de calibrado de capacidad antioxidante. De izquierda a derecha: Blanco (0 ppm), 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm.

En la Figura 32 se muestra la recta de calibrado, con los datos obtenidos del método espectrofotométrico del radical ABTS. Se representa la diferencia entre la absorbancia del blanco menos la absorbancia de cada muestra frente a la concentración de Trolox en ppm.

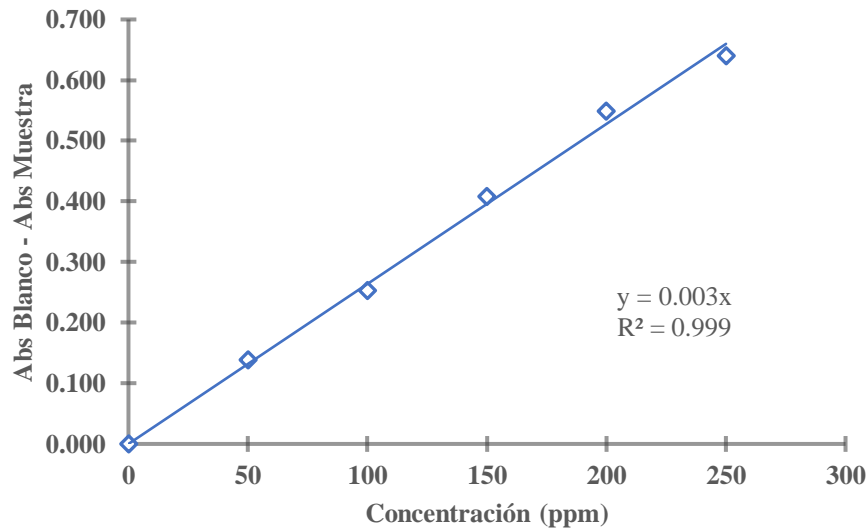


Figura 32. Recta de calibrado para determinar la capacidad antioxidante.

3.7. Determinación del Contenido de Fenoles Totales

Para cuantificar los compuestos fenólicos existentes en la muestra se empleó el método espectrofotométrico Folin – Ciocalteau descrito por Moussi et al. (2015) con algunas modificaciones. El compuesto de referencia usado fue ácido gálico (Sigma – Aldrich) para elaborar la curva de calibrado con concentraciones entre 0 y 100 ppm, al medir la absorbancia a 725 nm.

El procedimiento seguido se describe a continuación:

- i. Se añadieron 3 mL de Folin-Ciocalteau (VWR), en una concentración de 1:10, a 400 μ L de muestra en tubos cubiertos con papel aluminio. Para realizar el blanco se añadieron 3 mL de Folin-Ciocalteau (1:10) a 400 μ L de agua destilada.
- ii. Se incubaron los tubos en un baño a 22 °C durante 5 minutos.
- iii. Tras este tiempo, se añadieron 3 mL de bicarbonato de sodio (Sigma – Aldrich) al 6% (p/v) para volver a incubar en un baño de 22 °C durante 90 minutos.
- vi. Después se midió la absorbancia del blanco y de las muestras en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS™ 150) (Figura 33) a 725 nm.

El contenido de fenoles totales se expresó en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de muestra seca, utilizando la ecuación 4.

$$\frac{mg\ GAE}{g\ residuo\ seco} = \frac{Abs * F}{R * 1000} * \frac{1\ litro}{1000} * \frac{V_{H_2O}}{P_0} * \frac{100\ g\ de\ muestra}{X\ g\ de\ residuo\ seco} * 1000$$

Ecuación 4.

Donde:

Abs → Absorbancia medida en cada muestra.

F → Factor de dilución empleado en cada caso.

R → pendiente de la recta de calibrado, en la cual en el eje X se representa la concentración de ácido gálico en ppm y en el eje Y la absorbancia.

V_{H₂O} → volumen de agua utilizada para la hidrólisis.

P₀ → Peso inicial de cascarilla de cacao (15 g).

X → Porcentaje de residuo seco de cascarilla de cacao.



Figura 33. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ UV-Vis GENESYS™ 150.

En este método, a mayor concentración de polifenoles, mayor será la intensidad de color visible en el experimento. Este comportamiento se muestra en la Figura 34, en donde se tienen diferentes concentraciones del compuesto de referencia (ácido gálico) y se observa el incremento de la intensidad de color conforme aumenta la concentración de ácido gálico.



Figura 34. Patrones de ácido gálico para realizar la recta de calibrado del contenido de polifenoles totales. De izquierda a derecha: 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm.

En la Figura 35 se muestra la recta de calibrado, con los datos obtenidos del método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Se representa la absorbancia de cada muestra frente a la concentración de ácido gálico en ppm.

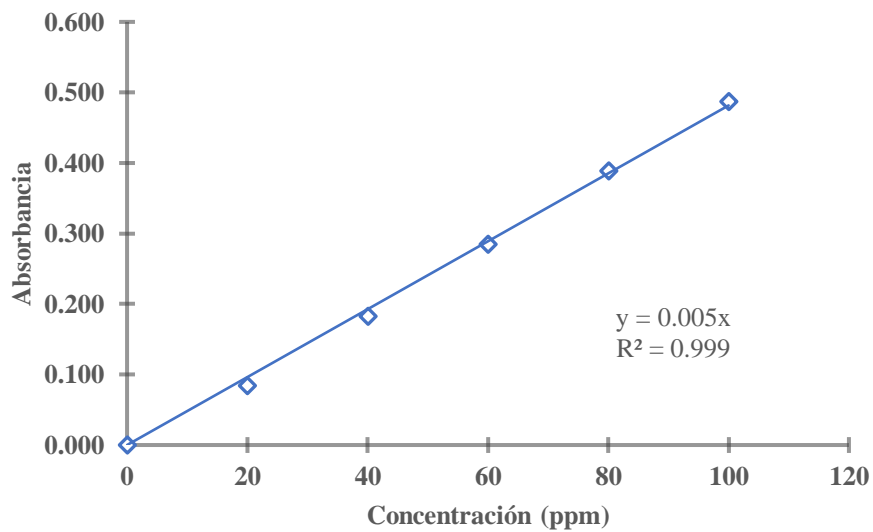


Figura 35. Recta de calibrado para determinar el contenido de polifenoles totales.



4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos de humedad y extracto seco de los diferentes lotes de cascarilla de cacao utilizados para los análisis en este proyecto, así como la evolución y comportamiento de la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos polifenólicos tras los tratamientos de hidrólisis térmica, a distintos valores de pH, se presentan a continuación.

Las condiciones a las que se trabajó en los procesos de hidrólisis se establecieron como las adecuadas para este residuo en trabajos previos como los de Borrallo (2019) y Delgado (2020), sin embargo, en este estudio se optimizaron dichas condiciones para mejorar los rendimientos.

4.1. Resultados experimentales

La cuantificación del contenido de humedad de un residuo tiene como objetivo determinar su porcentaje de extracto seco y de esta manera poder hallar la concentración de los compuestos de interés presentes en dicho residuo.

Se realizó la cuantificación de capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales a partir de cinco lotes de cascarilla de cacao procedentes de la industria chocolatera Chocolates del Norte S.A., por lo que en la Tabla 8 se muestran los valores de humedad para cada lote y un promedio de la humedad de la cascarilla de cacao utilizada.

Tabla 8. Porcentaje de humedad de los diferentes lotes de cascarilla de cacao analizados.

Número de lote	% Humedad	% Humedad media
1	10.01	
2	4.98	
3	7.12	6.50 ± 2
4	5.79	
5	4.60	

La cascarilla de cacao es un residuo seco que presenta un bajo contenido de humedad y por lo tanto, un elevado valor de porcentaje de extracto seco. En la Tabla 9 se muestra el porcentaje de extracto o residuo seco para cada lote empleado y un promedio de los cinco lotes.

**Tabla 9.** Porcentaje de residuo seco de los diferentes lotes de cascarilla de cacao analizados.

Número de lote	% Residuo Seco	% Residuo Seco medio
1	89.99	
2	95.02	
3	92.88	93.50 ± 2
4	94.21	
5	95.40	

El contenido de humedad de la cascarilla de cacao según varios autores, oscila entre 3.46 y 11.04 % (Martínez et al., 2012; Nazir et al., 2016; Rojo-Poveda et al., 2019; Sangronis et al., 2014; Villamizar-Jaimes & López-Giraldo, 2016; Watson et al., 2013), por lo que los valores de humedad obtenidos en este proyecto se encuentran dentro del rango indicado y su variación entre cada lote se debe a que la humedad de la cascarilla de cacao depende de varios factores, entre los cuales se tiene: la variedad del cacao, las condiciones climatológicas durante su cultivo, el almacenamiento de los granos y si la cascarilla proviene de granos que fueron o no sometidos a un tratamiento de tostado. Cabe señalar que la cascarilla utilizada para los análisis fue sometida a un proceso de tostado a temperaturas entre 164 y 166 °C por 35 minutos.

La evolución a lo largo del tiempo de la capacidad antioxidante analizada para cada valor de pH se muestra en la Figura 36. Los resultados están expresados en miligramos de Trolox equivalente por gramo de residuo o extracto seco.

Los resultados mostraron que, para todos los valores de pH ensayados, el tratamiento hidrotérmico mejora la capacidad antioxidante del caldo. Se observa que para valores de pH extremos de 2 y 3 se tiene un aumento de la capacidad antioxidante entre los tiempos 0 – 3 minutos, y a partir de los 5 minutos se mantiene relativamente constante. En el caso de pH 10 se tiene un aumento hasta los 5 minutos de hidrólisis y a partir de los 7 minutos se reduce la capacidad antioxidante. En cuanto a pH de 4 y 8 se observa un incremento en esta propiedad hasta los 7 minutos y a partir de los 10 minutos, se tiene una ligera disminución en el valor de la capacidad antioxidante. Por otra parte, a pH 5 se puede apreciar un aumento de esta propiedad hasta los 7 minutos de hidrólisis y a partir de este punto permanece prácticamente constante la capacidad antioxidante de los hidrolizados. Cabe recalcar que los hidrolizados de cascarilla de cacao sin adición de ácidos o bases (sin modificaciones de pH), presentan un pH de 5, es decir, este pH es el que normalmente

se obtiene al mezclar la cascarilla de cacao con el agua destilada en el proceso de hidrólisis.

Los mejores resultados se obtuvieron para los valores de pH de 4 y 8, siendo la capacidad antioxidante de los caldos de 37 mg TE/g de residuo seco al cabo de 7 min de tratamiento. Curiosamente, en el caso de pH 5 el máximo valor obtenido ha sido ligeramente inferior. Parece, por tanto, que una cierta adicción de ácido o base contribuye a liberar los compuestos antioxidantes de la matriz sólida, siendo en cierta medida destruidos cuando los valores de pH se vuelven más extremos.

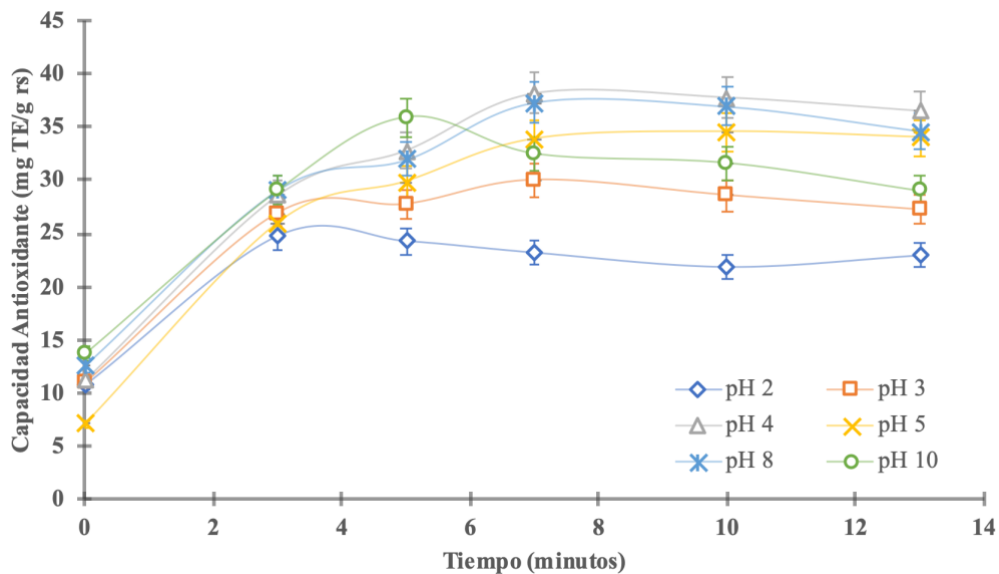


Figura 36. Evolución con el tiempo de tratamiento hidrotérmico de la capacidad antioxidante de los hidrolizados de cascarilla de cacao y a distintos pH.

Según Hernández-Hernández et al. (2018) los compuestos fenólicos constituyen alrededor del 10% de los granos de cacao y son responsables de sus propiedades antioxidantes, antitumorales, protectoras cardiovasculares, entre otras. Se almacenan en los cotiledones de las semillas de cacao; sin embargo, durante la fermentación se produce la pérdida de estos compuestos debido a la difusión fuera del cotiledón y como resultado, la cascarilla se convierte en un material rico en estos compuestos bioactivos.

La evolución a lo largo del tiempo del contenido de fenoles totales para cada valor de pH se muestra en la Figura 37. Los resultados están expresados en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de residuo o extracto seco y como se aprecia sigue una tendencia similar a la obtenida al medir la capacidad antioxidante.

En todos los casos, el tratamiento hidrotérmico aumenta la cantidad de polifenoles extraídos del residuo de cascarilla. Se observa que para valores de pH extremos de 2 y 3

se tiene un aumento del contenido de polifenoles entre los tiempos 0 y 13 minutos, pero estos valores son inferiores a los obtenidos incluso a pH de 5, que es el pH normal de la cascarilla de cacao al someterla a hidrólisis sin añadir ácidos o bases. En el caso de pH 10 se tiene un aumento hasta los 3 minutos de hidrólisis y a partir de los 5 minutos se reduce el contenido de polifenoles de los hidrolizados. En cuanto a pH de 4 y 8 se observa un incremento en esta propiedad hasta los 7 minutos y después se mantiene relativamente constante.

De nuevo se obtienen los mejores resultados con valores de pH de 4 y 8, siendo 7 minutos suficientes para obtener el valor máximo de polifenoles (14 mg GAE/g peso seco) en ambos casos. Los valores de pH más extremos fueron los que proporcionaron resultados más bajos y en el caso del pH intermedio de 5, los máximos valores obtenidos fueron de 14 mg GAE/g peso seco al cabo de 13 minutos de tratamiento hidrotérmico. Los resultados a pH 10, con un claro máximo a los 3 min de tratamiento, ponen de relieve dos efectos contrapuestos del tratamiento hidrotérmico que por una parte contribuyen a la liberación de polifenoles a partir del residuo de cascarilla pero que a tiempos más prolongados provoca la degradación de los mismos.

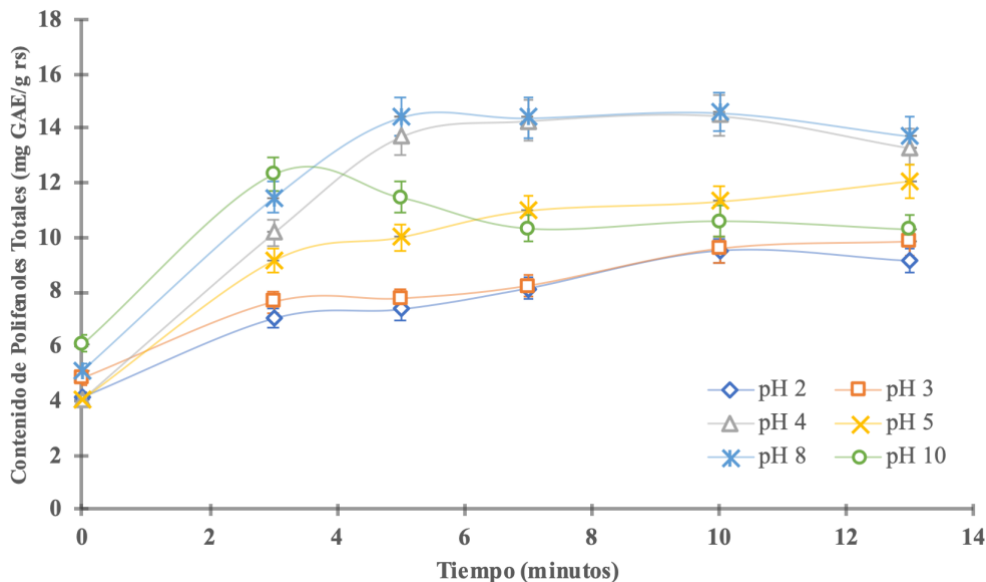


Figura 37. Evolución de los hidrolizados de cascarilla de cacao en el tiempo y a distintos pH en la determinación del contenido de polifenoles totales.

La relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales encontrada en las muestras de cascarilla de cacao después del tratamiento de hidrólisis térmica se indica en las figuras 38 a la 40. Se considera a tiempo cero la ausencia de

tratamiento y a 3, 5, 7, 10 y 13 minutos los diferentes tiempos de tratamiento hidrotérmico.

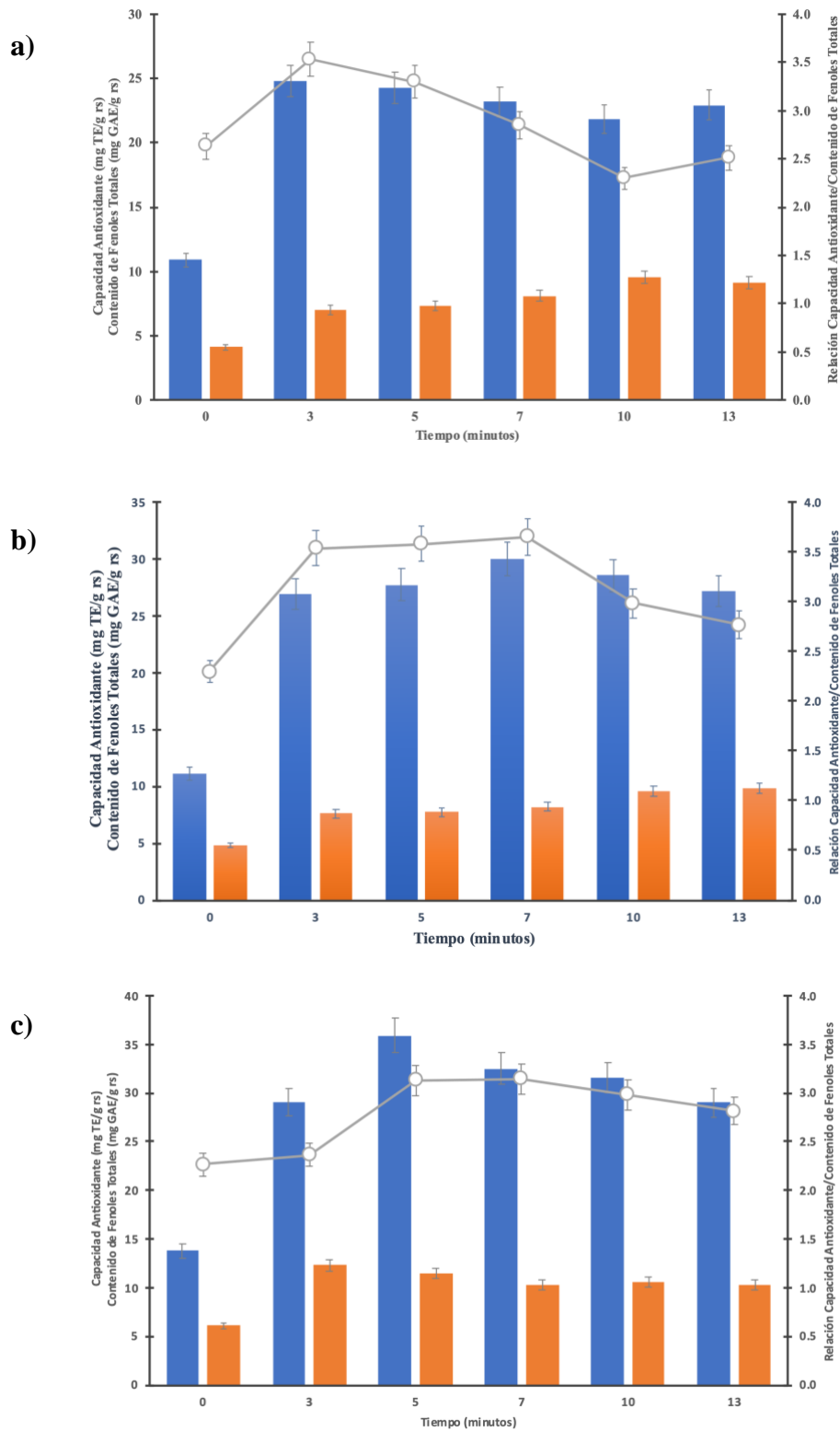


Figura 38. Capacidad antioxidante (azul), contenido de fenoles totales (naranja) y relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales (gris). a) pH 2, b) pH 3 y c) pH 10.

La figura 38 muestra la variación de la relación entre la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales a los valores de pH extremos de 2, 3 y 10. Esta relación varía entre 2.3 y 3.6 indicando la liberación de otros compuestos con capacidad antioxidante, al aumentar la relación, diferentes a los compuestos polifenólicos cuantificados.

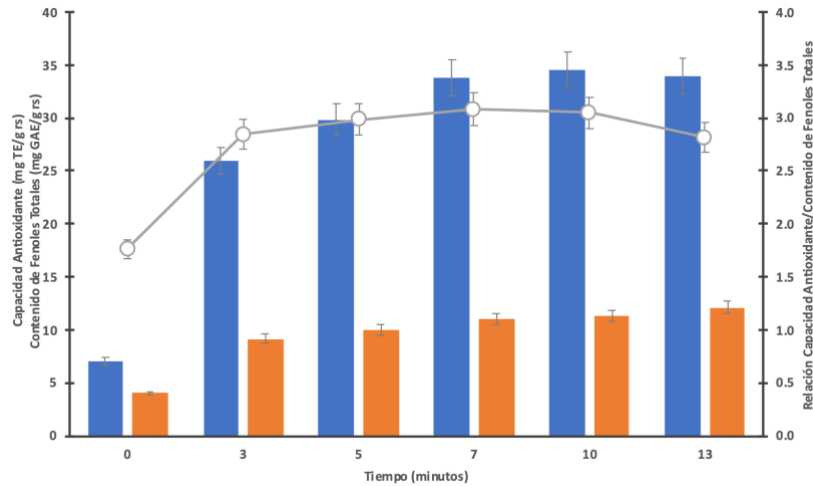


Figura 39. Capacidad antioxidante (azul), contenido de fenoles totales (naranja) y relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales (gris) a pH 5.

La figura 39 indica la relación entre capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales a pH 5. Se observa que a tiempo cero esta relación es de 1.8 pero al someter a las muestras a tratamiento hidrotérmico prácticamente permanece constante a los diferentes tiempos analizados, con variaciones entre 2.8 y 3, lo que indica que, a este pH específico, se extrae el mismo tipo de compuestos con capacidad antioxidante a todos los tiempos de hidrólisis.

Finalmente, en la figura 40 se observa la misma relación para los valores de pH a 4 y 8. Esta relación permanece prácticamente constante en ambas condiciones en 2.7 y 2.5 respectivamente. Este comportamiento muestra que tanto para las muestras sin tratamiento hidrotérmico como para los diferentes tiempos de hidrólisis se extraen de igual manera como en el caso anterior, el mismo tipo de compuestos con capacidad antioxidante a los distintos tiempos ensayados.

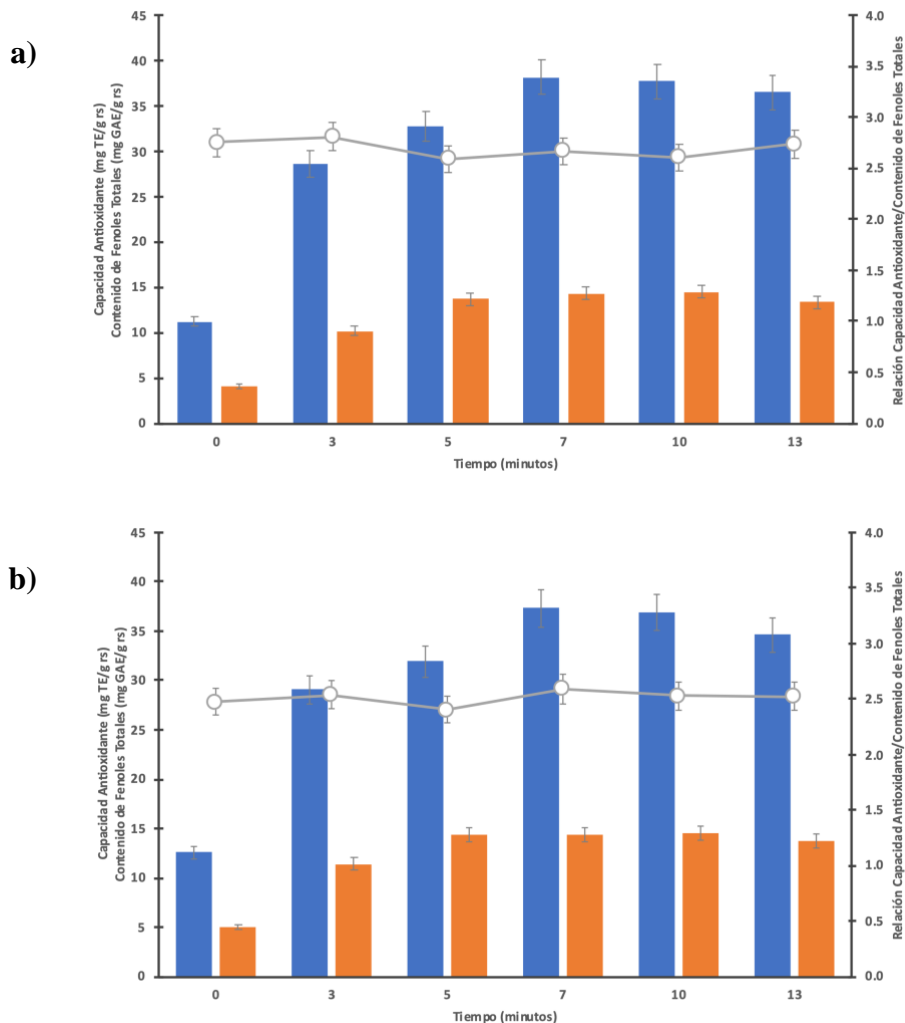


Figura 40. Capacidad antioxidante (azul), contenido de fenoles totales (naranja) y relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales (gris). a) pH 4 y b) pH 8.

4.2. Discusión y condiciones óptimas de operación

De acuerdo con los resultados analizados en los apartados 4.2, 4.3 y 4.4. se observó que al tiempo de 7 minutos de hidrólisis ácido-térmica a pH 4 y al mismo tiempo de hidrólisis alcalino-térmica a pH 8, se obtuvieron los mejores resultados para la capacidad antioxidante de la cascarilla de cacao. La Tabla 10 muestra los valores obtenidos para estas dos condiciones y se resalta en gris el tiempo al cual se obtuvo la mayor concentración de antioxidantes, expresado en miligramos de Trolox equivalente por gramo de residuo seco.

Los valores de 38.13 mg TE/g residuo seco para pH 4 y 37.31 mg TE/g residuo seco para pH 8 se transformaron a unidades de $\mu\text{mol TE/g}$ para poder comparar los resultados



obtenidos con otras técnicas de extracción y solventes utilizados por diferentes autores. Por lo tanto, a los 7 minutos a pH 4 se obtuvo 152 $\mu\text{mol TE/g}$ y 149 $\mu\text{mol TE/g}$ a pH 8 que se encuentra por debajo de los obtenidos por Soto (2012) quien empleó dos extracciones sucesivas, a la cascarilla de cacao, con metanol-agua (80:20, v/v) acidificado con HCl 0.1% y obtuvo valores entre 378.75 – 473.13 $\mu\text{mol TE/g}$ mediante el método de FRAP para su cuantificación. De igual manera, Grillo et al. (2019) utilizaron ultrasonido y cavitación hidrodinámica en fases hidroalcohólicas y de hexano (30:49:21, mezcla de Hex/EtOH/H₂O) para obtener por ultrasonido 204.7 $\mu\text{mol TE/g}$. Por el contrario, Lecumberri et al. (2007) realizaron un lavado con HCl 16 mM en solución acuosa de metanol al 50% con 40 ml de solución acetona-agua (70:30 v/v), obteniendo valores inferiores a los de esta investigación con 72.32 $\mu\text{mol TE/g}$ mediante el método FRAP y 7.73 $\mu\text{mol TE/g}$ mediante el método con el radical ABTS, ambos valores inferiores a los conseguidos en este trabajo.

Cabe recalcar que otros autores como Arlorio et al. (2005), Lessa et al. (2018), Fakhlaei et al. (2020), Amim & Yee (2006) y Martínez et al. (2012) también cuantifican la capacidad antioxidante de la cascarilla de cacao, sin embargo, debido a los métodos utilizados y a las unidades en las que se han expresado sus resultados no se pueden comparar con esta investigación, pero sí demuestran el interés de extraer estos compuestos bioactivos en la cascarilla de cacao para su aplicación en diferentes industrias como la cosmética, farmacéutica y alimentaria.

Tabla 10. Capacidad Antioxidante en mg TE/g rs.

Tiempo (min)	pH 4	pH 8
0	11.23	12.57
3	28.56	29.07
5	32.78	31.92
7	38.13	37.31
10	37.72	36.91
13	36.46	34.60

El grupo de antioxidantes más importantes presentes en el cacao son los polifenoles, seguido de las metilxantinas como la teobromina y cafeína, y minerales como Cu, Fe, Mn, Zn entre otros, que actúan como cofactores (Vásquez et al., 2019; Vásquez-Ovando et al., 2016).

En cuanto al contenido de fenoles totales en esta investigación, se obtuvieron las máximas concentraciones al tiempo de 10 minutos tanto para la hidrólisis ácido-térmica a pH 4 como para la hidrólisis alcalino-térmica a pH 8. Sin embargo, teniendo en cuenta la pequeña diferencia entre los valores a los tiempos de 7 y 10 minutos, se considera que la condición óptima para la extracción de estas biomoléculas es a 7 minutos, de acuerdo con los datos relativos a la máxima actividad antioxidante. La Tabla 11 muestra los valores obtenidos para estas dos condiciones, expresado en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de residuo seco, y se resalta en gris el tiempo de tratamiento considerado como óptimo.

El contenido de fenoles totales de la cascarilla de cacao corresponde en aproximadamente 36% catequina, 21% quercetina, 21% epicatequina, 11,3% ácido gálico, 6,5% ácido cumárico y 4,5% ácido prototécúico (Valadez-Carmona et al., 2017).

Tabla 11. Contenido de Fenoles Totales en mg GAE/g rs.

Tiempo (min)	pH 4	pH 8
0	4.08	5.08
3	10.17	11.45
5	13.71	14.42
7	14.30	14.41
10	14.48	14.59
13	13.31	13.73

Los resultados obtenidos de compuestos polifenólicos fueron superiores a los reportados por algunos autores al utilizar cascarilla de cacao, por ejemplo Mazzutti et al. (2018) emplearon procesos ecológicos integrados que utilizan CO₂ supercrítico y etanol presurizado logrando extraer entre 4 – 9.6 mg GAE/g extracto. Así también, Lecumberri et al. (2007) utilizando el método antes mencionado, consiguieron 5.78 mg GAE/g. De la misma manera, Grillo et al. (2019), extrajeron 7.1 y 11.7 mg GAE/g por ultrasonido y cavitación hidrodinámica, respectivamente.

Por el contrario, con esta investigación se alcanzaron valores inferiores a los indicados por Arlorio et al. (2005) al extraer mediante CO₂ supercrítico 18.2 mg GAE/g. De manera similar, Barbosa-Pereira et al. (2018) mediante extracción de campo eléctrico pulsado obtuvieron valores entre 24.93 – 32.30 mg GAE/g extracto seco.



Por último, Hernández-Hernández et al. (2018), a través de diferentes técnicas obtuvieron 49.46 mg GAE/g con extracción de agua acidificada-etanol, 20.39 mg GAE/g al usar agua acidificada-metanol y valores inferiores al de esta investigación al aplicar extracción con agua (5.77 mg GAE/g) y agua acidificada (9.40 mg GAE/g), pero un valor muy similar al emplear extracción con metanol-agua (14.64 mg GAE/g).

Las diferencias entre los resultados expuestos pueden ser debidas en cierta medida al origen de las muestras y a la conservación de los granos de cacao, además de otros factores como: el disolvente usado en la extracción, la variedad de los granos de cacao, el grado de madurez, origen geográfico y condiciones pos-cosecha como la fermentación, secado, tostado, almacenamiento y procesamiento (Carrillo et al., 2014).

La revisión bibliográfica indica la existencia de métodos que consiguen extraer mayor cantidad de polifenoles que los aquí obtenidos, si bien en algunos trabajos los logros son similares o inferiores. Además, cabe destacar que el método aquí propuesto resulta más sencillo que la mayoría y evita tener que emplear disolventes orgánicos como la acetona o el metanol, costosos y menos adecuados que el agua para futuras aplicaciones en el campo de la industria alimentaria.

Adicionalmente, cabe indicar que existen otras fuentes naturales que presentan menor capacidad antioxidante que las obtenidas en esta investigación, las cuales son (en $\mu\text{mol TE/g}$): el cilantro (70), perejil (63), cáscara de arándanos (59.10), cáscara de aguacate (34.72), cáscara de mango (93.10), entre otros. Valores superiores para esta propiedad se pueden encontrar en alimentos como el tomillo (381 $\mu\text{mol TE/g}$). En cuanto al contenido de fenoles totales, el tomate de árbol (1.23 mg GAE/g) y la cáscara de alimentos como (en mg GAE/g): manzana roja (4.37), aguacate (7.20), arándanos (8.92), café (12.03), etc., muestran valores inferiores a los obtenidos en esta investigación, pero el mango (22.95) y la chirimoya (17.77) presentan mayores concentraciones de estos compuestos bioactivos. La diferencia de concentraciones de estas biomoléculas en los distintos alimentos está determinada por las interacciones entre los diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción, lo que implica un cambio en la capacidad antioxidante total de los alimentos. Además, al cuantificar estas propiedades se debe evaluar los contenidos fenólicos lipofílicos e hidrofílicos y su capacidad antioxidante, es decir, considerando tanto los componentes solubles en grasa y en agua. (Barbosa-Pereira et al., 2018; Deng et al., 2012; Mercado-Mercado et al., 2013).



Los resultados obtenidos en esta investigación aseguran que la cascarilla de cacao es una potencial fuente de compuestos bioactivos como los antioxidantes y polifenoles, que hacen que el uso de este subproducto de la industria del chocolate, sea una alternativa para producción de moléculas de alto valor añadido con aplicaciones potenciales en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.



5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados observados en los apartados anteriores, se evidenció que los tratamientos de hidrólisis térmica mejoran notablemente la posibilidad de extracción de compuestos bioactivos, que se solubilizan en el caldo obtenido. Así, en ausencia de este tratamiento se obtuvieron valores entre 7.08 – 13.78 mg TE/g residuo seco para la capacidad antioxidante y 4.02 – 6.08 mg GAE/g residuo seco para el contenido de polifenoles totales. Sin embargo, las máximas concentraciones obtenidas al someter a las muestras de cascarilla de cacao a tratamientos hidrotérmicos fueron de 38.13 mg TE/g para la capacidad antioxidante, y 14.59 mg GAE/g para el contenido de fenoles totales.

Por otra parte, los hidrolizados de cascarilla de cacao mostraron una mayor capacidad antioxidante después de ser tratados durante 7 minutos a valores de pH de 4 y 8. En cuanto a los mejores resultados en la determinación de contenido de fenoles totales se obtuvieron también a pH 4 y 8, tras 10 minutos de tratamiento hidrotérmico. Sin embargo, debido a su ligera variación con respecto al tiempo de 7 minutos, se tomó como condición óptima tanto para capacidad antioxidante y contenido de polifenoles el tiempo de 7 minutos.

Adicionalmente, el empleo de tiempos más prolongados para los procesos de hidrólisis provoca una disminución en la concentración de los compuestos bioactivos, por lo que exponer a la cascarilla a temperaturas más elevadas durante un tiempo más prolongado degrada los productos de interés e implica costes energéticos innecesarios.

Finalmente, los resultados de esta investigación mostraron el interés de profundizar en las opciones de revalorización de un subproducto de la industria del chocolate que se genera a gran escala y representa una preocupación ambiental, pero que debido a su composición química y características estructurales, presenta potenciales aplicaciones en el campo alimentario y de la salud.



6. RECOMENDACIONES

- Realizar experimentos a distintas temperaturas y tiempos para analizar el comportamiento de los compuestos bioactivos a dichas condiciones.
- Determinar los tipos de antioxidantes y compuestos polifenólicos obtenidos después de la extracción hidrotérmica y compararlos con los logrados mediante otros métodos de extracción y solventes empleados.
- Analizar la composición nutricional del producto obtenido y evaluar su posible empleo como base para la obtención de una bebida chocolatada rica en antioxidantes.



REFERENCIAS

- (INEC), I. N. de E. y C. (2002). III Censo Nacional Agropecuario de la República del Ecuador. *Censo Nacional Agropecuario, 1*, 57.
https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/CNA/Tomo_CNA.pdf
- Adomako, D. K. (2006). *Project on pilot plants to process cocoa by-products. Summary report on a pilot project in Ghana. 131*, 24. <https://www.icco.org/wp-content/uploads/2019/07/EX-131-7-Add-1-Ghna-Cocoa-By-Products-1.pdf>
- Afoakwa, E. (2010). Chocolate Science and Technology. In *Science and Technology of Enrobed and Filled Chocolate, Confectionery and Bakery Products*. Wiley-Blackwell.
- Amim, I., & Yee, C. L. (2006). Antioxidative effects of extracts of Cocoa Shell, Roselle Seeds and a combination of both extracts on the susceptibility of cooked beef to lipid oxidation. In *Journal of Food Technology* (Vol. 4, Issue 1, pp. 10–15).
- Anecacao. (2015). *Cacao CCN 51*. <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/cacaoccn51.html>
- Anecacao. (2019). *Estadísticas de Exportación de Cacao*.
<http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>
- Anecacao. (2020). *La Industria Chocolatera Ecuatoriana*.
<http://www.anecacao.com/index.php/es/noticias/la-industria-chocolatera-ecuatoriana.html>
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobroma cacao hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International, 38*(8–9), 1009–1014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.012>
- Banco Central del Ecuador. (2019). *Sectores claves de la economía a través de la matriz Insumo - Producto*. <https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo/item/1145-bce-presenta-los-sectores-claves-de-la-economia-a-traves-de-la-matriz-insumo-producto>
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V., & Frígola, A. (2013). A Comparative Study of the Analysis of Antioxidant Activities of Liquid Foods Employing Spectrophotometric, Fluorometric, and Chemiluminescent Methods.



- Food Analytical Methods*, 6(1), 317–327. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9441-3>
- Barbosa-Pereira, L., Guglielmetti, A., & Zeppa, G. (2018). Pulsed Electric Field Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cocoa Bean Shell and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 11(4), 818–835. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2045-6>
- Beckett, S. (2008). The science of chocolate. In *Journal of Chemical Education* (2nd Editio, Vol. 79, Issue 2). RSC Publishing. <https://doi.org/10.1021/ed079p167.2>
- Borralló, C. (2019). *Valorización de la cascarilla de cacao, residuo de la industria chocolatera, para su empleo como sustrato en procesos fermentativos*. Universidad de Oviedo.
- Bouras, M., Chadni, M., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>
- Carrasco, O. (2015). *Obtención de harina baja en gluten a partir de la cascarilla de cacao de las variedades CCN-51 y Nacional* [Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/3647/1/CD000020-TRABAJO_COMPLETO-pdf
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Club del Cacao. (2018). *Los Cacaos Antiguos, Genética del Cacao*. <https://elclubdelchocolate.blogspot.com/2018/04/los-cacaos-antiguos-genetica-del-cacao.html>
- Criado, C., & Moya, M. S. (2009). Vitaminas y antioxidantes. *Departamento De Medicina De La Universidad Autonoma De Madrid*, 5–33. http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf?botsearch
- Delgado, P. (2020). *Obtención de productos de interés biotecnológico a partir de la cascarilla cacao*. Universidad de Oviedo.
- Deng, G. F., Shen, C., Xu, X. R., Kuang, R. D., Guo, Y. J., Zeng, L. S., Gao, L. L., Lin,



- X., Xie, J. F., Xia, E. Q., Li, S., Wu, S., Chen, F., Ling, W. H., & Li, H. Bin. (2012). Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8308–8323.
<https://doi.org/10.3390/ijms13078308>
- Díaz, A. (2015). *Hidrólisis de residuos de la venta de verduras y hortalizas para la producción de bioetanol*. 1–61.
- Díaz, M. (2017). Sistema de peligros y puntos críticos de control (HACCP), en tres formulaciones en la elaboración de chocolate para taza, en la Empresa Industrias Sol Norteño. *Universidad Nacional Toribio Rodríguez Mendoza De Amazonas*, 87.
- Fakhlai, R., Rozzamri, A., & Hussain, N. (2020). Composition, color and antioxidant properties of cocoa shell at different roasting temperatures. *Food Research*, 4(3), 585–593. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(3\).251](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(3).251)
- Falesi, R., Moraes, P. De, Chagas, S., & Gurjão, C. (2018). *Cocoa Market Setting in the State of Pará : National and Regional Aspects*.
- FAO. (1984). *Cocoa*. <http://www.fao.org/3/ad220e/AD220E00.htm#TOC>
- FAO, (Food and Agriculture Organization). (2001). Importance of Cocoa. *October, January*, 1–4. http://www.fao.org/docs/eims/upload/216251/Infosheet_Cocoa.pdf
- FAO, (Food and Agriculture Organization). (2020). *El encanto del chocolate de origen ecuatoriano*. <http://www.fao.org/ecuador/noticias/detail-events/ru/c/1295417/>
- FAOSTAT. (2020a). *Cultivos*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- FAOSTAT. (2020b). *Productos por país*.
http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity
- Fortune Business Insights. (2020). *Cocoa and Chocolate Market*.
<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/cocoa-and-chocolate-market-100075>
- Grillo, G., Boffa, L., Binello, A., Mantegna, S., Cravotto, G., Chemat, F., Dizhbite, T., Lauberte, L., & Telysheva, G. (2019). Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International*, 115(May 2018), 200–208.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.057>
- Hartel, R. W., von Elbe, J. H., & Hofberger, R. (2018). *Confectionery Science and Technology*. Springer International Publishing.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-61742-8_15



- Heras, S. (2015). *Capacidad antioxidante de la dieta española*.
http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/SILVIA_HERAS_VILLAREAL.pdf
- Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A. M., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2018). Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240(February 2017), 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.018>
- Herreño, M., & Serrano, E. (2014). *Estandarización del proceso de elaboración de chocolate de mesa mejorando la calidad organoléptica del producto final en la fábrica INSA LTDA (Cimitarra, Santander)*. Universidad Industrial de Santander (UIS).
- International Cocoa Organization. (2016). Sustainable Cocoa Economy: a Comprehensive and Participatory Approach. *Twelfth Meeting, December 2006*, 1–10. <https://www.icco.org/wp-content/uploads/2019/07/CB-11-2-Rev.1-Sustainable-Cocoa-Economy-edited-1.pdf>
- International Cocoa Organization, I. (2020). *Who are the main manufacturers of chocolate in the world?* <https://www.icco.org/chocolate-industry/>
- Kootstra, A. M. J., Beeftink, H. H., Scott, E. L., & Sanders, J. P. M. (2009). Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-31>
- Kuskoski, E. M., G. Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar Actividad Antioxidante en pulpa de frutos. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 18.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104(3), 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.054>
- Lessa, O. A., Reis, N. dos S., Leite, S. G. F., Gutarra, M. L. E., Souza, A. O., Gualberto, S. A., de Oliveira, J. R., Aguiar-Oliveira, E., & Franco, M. (2018). Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 107–113. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0196-x>
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant



- capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73, 40–45.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>
- Marketing, M. (2019). *LA INDUSTRIA CHOCOLATERA GENERA 98.300 MILLONES DE DÓLARES*. <https://www.mundomarketing.com/la-industria-chocolatera-genera-98-300-millones-de-dolares/>
- Márquez, C., Otero, C., Rojano, B., & Osorio, J. (2014). Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* s.) en poscosecha. *Temas Agrarios*, 19(2), 173–184.
<https://doi.org/10.21897/rta.v19i2.732>
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Mazzutti, S., Rodrigues, L. G. G., Mezzomo, N., Venturi, V., & Ferreira, S. R. S. (2018). Integrated green-based processes using supercritical CO₂ and pressurized ethanol applied to recover antioxidant compounds from cocoa (*Theobroma cacao*) bean hulls. *Journal of Supercritical Fluids*, 135(October 2017), 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.039>
- Mercado-Mercado, G., Carrillo, L. de la R., Wall-Medrano, A., Díaz, J. A. L., & Álvarez-Parrilla, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutricion Hospitalaria*, 28(1), 36–46.
<https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Morales De La Rosa, S. (2015). *HIDRÓLISIS ÁCIDA DE CELULOSA Y BIOMASA LIGNOCELULÓSICA ASISTIDA CON LÍQUIDOS IÓNICOS*. 15.
- Moreno, J. F. (2020). *Fraccionamiento mediante ultrafiltración de hidrolizados procedentes de biomasa residual para la recuperación de biomoléculas de interés industrial*. Universidad de Oviedo.
- Moussi, K., Nayak, B., Perkins, L. B., Dahmoune, F., Madani, K., & Chibane, M. (2015). HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Industrial Crops and Products*, 74, 858–866. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.015>
- Nazir, N., Novelina, Juita, E., Amelia, C., & Fatli, R. (2016). Optimization of pre-treatment process of cocoa pod husk using various chemical solvents. *International*



- Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 6(3), 403–409. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.6.3.848>
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>
- Oliveras, J. M. (2007). La elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica. *Técnica Industrial*, 268, 46–51.
<http://www.tecnicaindustrial.es/tiadmin/numeros/28/37/a37.pdf>
- Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Šubarić, D., & Pavlović, N. (2018). Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(6), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061404>
- Perez Lara, G., & Cornejo Z., F. (2009). *Mejora en el proceso de temperado del chocolate en una industria chocolatera ecuatoriana*. 13.
<https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/1729>
- Produlce. (2019). *Informe anual*. [http://produlce.com/filemanager/source/INFORME ANUAL PRODULCE 2019.pdf](http://produlce.com/filemanager/source/INFORME%20ANUAL%20PRODULCE%202019.pdf)
- Quan, W., Qie, X., Chen, Y., Zeng, M., Qin, F., Chen, J., & He, Z. (2020). Effect of milk addition and processing on the antioxidant capacity and phenolic bioaccessibility of coffee by using an in vitro gastrointestinal digestion model. *Food Chemistry*, 308(April 2019), 125598.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125598>
- Recanati, F., Marveggio, D., & Dotelli, G. (2018). From beans to bar: A life cycle assessment towards sustainable chocolate supply chain. *Science of the Total Environment*, 613–614, 1013–1023.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.187>
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1995). Antioxidants - the case for fruit and vegetables in the diet. *British Food Journal*, 97(9), 35–40.
<https://doi.org/10.1108/00070709510100163>
- Rodríguez, R. A., & González, L. G. (2012). *Producción chocolatera en Ecuador: propuesta para incrementar el potencial productor y exportador* [Universidad Politécnica Salesiana].
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/2653/14/UPS-GT000302.pdf>



- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., & Zeppa, G. (2019). Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, *11*(4), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/nu11040867>
- Roth, K. (2010). Chocolate—The Noblest Polymorphism II. *ChemViews*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chemv.201000030>
- Sánchez, J. P. (2013). *Evaluación energética de cáscaras de Cacao Nacional y CCN-51* [Universidad de Cuenca].
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4508/1/tesis.pdf>
- Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, Y., & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao Venezolano como materia prima de infusiones. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, *64*(2), 123–130.
- Soto, M. (2012). *Desarrollo Del Proceso De Producción De Cascarilla De Semilla De Cacao En Polvo Destinada Al Consumo Humano*. 69.
<http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/07/000155680.pdf>
- Sridhar, K., & Charles, A. L. (2019). In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH [rad] and ABTS [rad] assays: Estimation methods for EC 50 using advanced statistical programs. *Food Chemistry*, *275*(August 2018), 41–49.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.040>
- Terán, F. (2019). *Aprovechamiento de la cascarilla de cacao (Theobroma Cacao L.) para la elaboración de un producto agroindustrial*. Universidad de las Américas.
- Valadez-Carmona, L., Plazola-Jacinto, C. P., Hernández-Ortega, M., Hernández-Navarro, M. D., Villarreal, F., Necochea-Mondragón, H., Ortiz-Moreno, A., & Ceballos-Reyes, G. (2017). Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao L.*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *41*(April), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012>
- Vásquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Góes Neto, A., & Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, *90*, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que



- regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 656(3), 239–254.
- Villamizar-Jaimes, A., & López-Giraldo, L. (2016). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Respuestas*, 22(1), 75–83.
<http://revistas.ufps.edu.co/ojs/index.php/respuestas/article/view/821/784>
- Watson, R. R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013). Chocolate in health and nutrition. *Chocolate in Health and Nutrition*, 1–553. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0>
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., & Li, H. Bin. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 20–31.
<https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Yi Chang, A. (2017). Importancia del proceso de temperado en la elaboración del chocolate a nivel industrial. *Universidad Agraria La Molina*, 100.