



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA**

**Cuantificación de compuestos fenólicos de las almendras de cacao para su aplicación y evaluación antimicrobiana en leche cruda.**

**VILLEGAS VELEZ LEYNER ALEXANDER  
INGENIERO QUIMICO**

**MACHALA  
2024**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA**

**Cuantificación de compuestos fenólicos de las almendras de cacao  
para su aplicación y evaluación antimicrobiana en leche cruda.**

**VILLEGAS VELEZ LEYNER ALEXANDER  
INGENIERO QUIMICO**

**MACHALA  
2024**



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD**

**CARRERA DE INGENIERIA QUIMICA**

**TRABAJOS EXPERIMENTALES**

**Cuantificación de compuestos fenólicos de las almendras de cacao  
para su aplicación y evaluación antimicrobiana en leche cruda.**

**VILLEGAS VELEZ LEYNER ALEXANDER  
INGENIERO QUIMICO**

**ARMIJOS CABRERA GABRIELA VIVIANA**

**MACHALA  
2024**

# Cuantificación de compuestos fenólicos de las almendras de cacao para su aplicación y evaluación antimicrobiana en leche cruda

*por Leyner Alexander Villegas Vélez*

---

**Fecha de entrega:** 13-ago-2024 11:09p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2431820229

**Nombre del archivo:** Tesis\_CCN51-FINAL.pdf (3.28M)

**Total de palabras:** 14898

**Total de caracteres:** 72187

# Cuantificación de compuestos fenólicos de las almendras de cacao para su aplicación y evaluación antimicrobiana en leche cruda

## INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://portal.amelica.org">portal.amelica.org</a> Fuente de Internet	1%
2	<a href="http://repositorio.unas.edu.pe">repositorio.unas.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://repository.unad.edu.co">repository.unad.edu.co</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	<1%
6	<a href="http://9pdf.net">9pdf.net</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="http://rdu.unc.edu.ar">rdu.unc.edu.ar</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="http://pirhua.udep.edu.pe">pirhua.udep.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%

9	<a href="http://pt.scribd.com">pt.scribd.com</a> Fuente de Internet	<1 %
10	<a href="http://repositorio.ucsg.edu.ec">repositorio.ucsg.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="http://repositorio.unheval.edu.pe">repositorio.unheval.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="http://dspace.ueb.edu.ec">dspace.ueb.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://educapes.capes.gov.br">educapes.capes.gov.br</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://www.colibri.udelar.edu.uy">www.colibri.udelar.edu.uy</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://1library.co">1library.co</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://lebascom.files.wordpress.com">lebascom.files.wordpress.com</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="http://www.dspace.uce.edu.ec:8080">www.dspace.uce.edu.ec:8080</a> Fuente de Internet	<1 %
18	<a href="http://www.repositorio.unam.edu.pe">www.repositorio.unam.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
19	<a href="http://www.tdx.cat">www.tdx.cat</a> Fuente de Internet	<1 %
20	Submitted to Universidad Nacional de Colombia	<1 %

21

[repositorio.usm.cl](https://repositorio.usm.cl)

Fuente de Internet

<1 %

---

22

[riaa.uaem.mx](https://riaa.uaem.mx)

Fuente de Internet

<1 %

---

23

Submitted to Mondragon Unibertsitatea

Trabajo del estudiante

<1 %

---

24

Sergio M. Pico Hernández, Jaime Jaimes Estévez, Luis J. López Giraldo, Cristian Jhair Murillo Méndez. "Supercritical extraction of bioactive compounds from Cocoa husk: study of the main parameters", Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia, 2019

Publicación

<1 %

---

25

Tamara Fukalova Fukalova. "Caracterización nutricional y aromática de especies infravaloradas de hoja comestible", Universitat Politecnica de Valencia, 2022

Publicación

<1 %

---

26

[repositorio.unbosque.edu.co](https://repositorio.unbosque.edu.co)

Fuente de Internet

<1 %

---

27

[lpi.oregonstate.edu](https://lpi.oregonstate.edu)

Fuente de Internet

<1 %

---

28

[repositorio.ulvr.edu.ec](https://repositorio.ulvr.edu.ec)

Fuente de Internet

<1 %

---

---

Excluir citas Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía Activo

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, VILLEGAS VELEZ LEYNER ALEXANDER, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Cuantificación de compuestos fenólicos de las almendras de cacao para su aplicación y evaluación antimicrobiana en leche cruda., otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.



VILLEGAS VELEZ LEYNER ALEXANDER

1900649888

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a la memoria imborrable e inolvidable de mi Madre Estrellita del Rocío Velez Intriago que siempre era su deseo de ver en mi triunfar y lograr una meta académica como lo es el título universitario; a mi padre Mariano de Jesús Villegas Aguirre que ha estado apoyando, en especial, esta última etapa siendo uno de las etapas difíciles para mí.

A mis hijos Dylan Josué, Yurem Alexander y Henry Ariel por haberme permitido ser padre, amigo y confidente en cada objetivo que hemos logrado atravesar, recordando a la vez como hijo, las últimas palabras de mi madre antes de partir de este mundo, y ahora dichas palabras has he forjado en ellos: *“Cada decisión que elijas, no te arrepientas; porque siempre estaré detrás de ti apoyándote, y cada decisión que tomes también será mía, confía en ti hijo mío”*.

**Leyner Alexander Villegas Velez**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente a Dios, por permitirme estar y gozar de buena salud, tener sabiduría, conocimiento y no rendirme, y finalmente llegar a estas instancias de mi vida académica logrando alcanzar metas y objetivos propuestos desde el inicio de esta travesía universitaria.

Agradezco a mi familia que ha estado lo más cerca posible de mí, que a pesar de la distancia he podido contar con su apoyo incondicional siendo muy fundamental en el aspecto emocional y afectivo, acompañándome en cada paso que he dado.

Agradecimiento especial para los docentes, Ing. Gabriela Armijos Mgs, Dr. Fredis Pesantez e Ing. José Humberto Ayala, tutora, cotutor y director del proyecto de investigación respectivamente, por haberme aceptado y ser parte de este proyecto desde el inicio hasta la culminación de la misma, y a los docentes Dra. Mercedes Campo y Dr. Osmany Cuesta, por la asesoría técnica en los experimentos de análisis cromatográficos y capacidad antioxidante, logrando cumplir con los objetivos planteados en este proyecto de investigación.

Finalmente, agradecer a los docentes que estuvieron y siguen ejerciendo la docente académica universitaria por la enseñanza y conocimiento impartido durante esta travesía: Ing. María Elena Yáñez, Ing. Delly SanMartin, Ing. Ofelia Granda, Ing. Wilson León, Ing. Byron Lapo, Ing. Tanya Carchi, Dr. Freddy Pereira, Ing. Susana Blacio, Ing. Katty Gadway, Dr. Jaime Morales, Ing. Diana Chamorro, Ing. Washington Espinoza, Ing. Martha Porras, Ing. Nelson Pachucho (+), Ing. Jorge Luis González, Bioq. Ricardo León, Bioq. Fausto Durán, Dr. Hugo Romero, Ing. Erick Vivanco, Ing. Braulio Madrid e Ing. Víctor Hugo González.

**Leyner Alexander Villegas Velez**

## RESUMEN

Los compuestos fenólicos son una amplia clase de metabolitos secundarios de las plantas y frutas, siendo muy conocidos por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas; dentro de la salud son conocidas también como desinflamatorias y anticancerígenas; desempeñando un papel crucial en la defensa de las plantas contra el estrés ambiental.

Las almendras de cacao en especial las variedades criollas, nacional y CCN-51 son muy ricas en compuestos fenólicos, lo que las convierte en un objeto de estudio muy importante, obviamente dependiendo de variedad y el método de procesamiento. La finalidad de este proyecto de investigación se centra en el contenido de polifenoles totales para ser aplicados y evaluados como conservante natural en alimentos procesados o sin tratamiento.

Los tratamientos realizados a las almendras de cacao fueron preparados en 4 muestras (M1, M2, M3, M4) y disueltas en soluciones etanólicas en agua en diferentes relaciones: Agua estéril, etano-agua 50:50, etanol-agua 70:30, etanol 100% respectivamente.

La liofilización permitió que los polifenoles sean extraídos en mayores concentraciones, para posteriormente ser cuantificados a un  $p\text{-valúe}=5.08E^{-11}$ , existiendo diferencias significativas entre las muestras M1= $2.667\pm 0.13$  mg/g muestra, M2= $7.718\pm 0.14$  mg/g muestra, M3= $10.996\pm 0.04$  mg/g muestra y M4= $16.482\pm 6.53E^{-5}$  mg/g; de la misma forma, para el contenido de azúcares reductores, donde hubo diferencias significativas con  $p\text{-valúe}=9.30E^{-9}$ , con valores obtenidos en M1= $10.830\pm 0.16$  mg/g muestra, M2= $7.411\pm 0.13$  mg/g muestra, M3= $4.257\pm 0.16$  mg/g muestra y M4= $2.799\pm 4.93E^{-4}$  mg/g muestra.

La determinación de la capacidad antioxidante obtenidos de los extractos polifenólicos también existieron diferencias significativas con un  $p\text{-valúe}=2.49E^{-8}$ , con resultados en M1= $1.325\pm 8.67E^{-4}$  mg/g muestra, M2= $2.140\pm 1.89E^{-3}$  mg/g muestra, M3= $3.031\pm 4.47E^{-3}$  mg/g muestra y M4= $4.432\pm 0.07$  mg/g muestra.

Los análisis realizados por CLAE en las muestras M1 Y M4 se logró identificar compuestos fenólicos en ambas muestras, tales como catequinas con RT=0.63 min, m/z=296.16 mg y 9.08ppm; teobromina con RT=8.05 min, m/z=181.07 mg y 10ppm; ácido gálico con RT=3.63 min, m/z=165.14 mg y 13.03ppm; ácido Vanílico RT=14.33 min, m/z=171.02 mg y 11.34ppm; Resveratrol con RT=17.01 min, m/z=168.01 mg y 10.89ppm, entre otras; cumpliendo funciones de inhibición antimicrobiana en la leche cruda.

El análisis microbiológico permitió evaluar la leche cruda, aplicando compuestos fenólicos en diferentes concentraciones: C1=3%, C2=5% y C3=7%, con alta capacidad antioxidante y efecto inhibidor de microorganismos, observando notoriamente la disminución de la actividad antimicrobiana por el uso de los polifenoles como conservante natural en alimentos sin tratamiento, permitiendo reducir los microorganismos predominantes.

En el recuento de colonias, se realizó un control de microorganismos leche cruda sin presencia de fenoles con 510UFC, y otras muestras evaluadas con presencia de fenoles en microorganismos predominantes en *E. Coli*: C1=91UFC, C2=65UFC y C3=42UFC con efecto inhibidor en C1=82%, C2=87% y C3=92%; *aerobios mesófilos*: C1=75UFC, C2=63UFC y C3=45UFC con efecto inhibidor en C1=85%, C2=88% y C3=91%, y mohos y levaduras: C1=240UFC, C2=192UFC y C3=136UFC con efecto inhibidor en C1=53%, C2=62% y C3=73%.

**Palabras Claves:** Compuestos fenólicos, Folin Ciocalteu, DNS, polifenoles, CLAE, capacidad antioxidante, crecimiento antimicrobiano.

## ABSTRACT

Phenolic compounds are a broad class of secondary metabolites from plants and fruits, being well known for their antioxidant and antimicrobial properties; within health with also known as anti-inflammatory and anti-cancer; playing a crucial role in defending plants against environmental stress.

Cocoa beans, especially the Creole, Nacional and CCN-51 varieties, are very rich in phenolic compounds, which makes them a very important object of study, obviously depending on the variety and the processing method. The purpose of this research project focuses on the content of total polyphenols to be applied and evaluated as a natural preservative in processed or untreated foods.

The treatments carried out on the cocoa beans were prepared in 4 samples (M1, M2, M3, M4) and dissolved in ethanolic solutions in water in different ratios: Sterile water, ethane-water 50:50, ethanol-water 70:30, 100% ethanol respectively.

Lyophilization allowed the polyphenols to be extracted in higher concentrations, to subsequently be quantified at a  $p$ -value=5.08E-11, with significant differences between the samples  $M1=2.667\pm 0.13$  mg/g sample,  $M2=7.718\pm 0.14$  mg/g/g sample. g sample,  $M3=10.996\pm 0.04$  mg/g sample and  $M4=16.482\pm 6.53E-5$  mg/g; In the same way, for the content of reducing sugars, where there were significant differences with  $p$ -value=9.30E-9, with values obtained in  $M1=10.830\pm 0.16$  mg/g sample,  $M2=7.411\pm 0.13$  mg/g sample,  $M3=4.257\pm 0.16$  mg/g sample and  $M4=2.799\pm 4.93E-4$  mg/g sample.

The determination of the antioxidant capacity obtained from the polyphenolic extracts also showed significant differences with a  $p$ -value=2.49E-8, with results in  $M1=1.325\pm 8.67E-4$  mg/g sample,  $M2=2.140\pm 1.89E-3$  mg/ g sample,  $M3=3.031\pm 4.47E-3$  mg/g sample and  $M4=4.432\pm 0.07$  mg/g sample.

The analyzes carried out by CLAE in samples M1 and M4 were able to identify phenolic compounds in both samples, such as catechins with RT=0.63 min, m/z=296.16 mg and 9.08 ppm; theobromine with RT=8.05 min, m/z=181.07 mg and 10ppm; gallic acid with RT=3.63 min, m/z=165.14 mg and 13.03ppm; Vanillic acid RT=14.33 min, m/z=171.02 mg and 11.34ppm; Resveratrol with RT=17.01 min, m/z=168.01 mg and 10.89ppm, among others; fulfilling antimicrobial inhibition functions in raw milk.

The microbiological analysis allowed the evaluation of raw milk, applying phenolic compounds in different concentrations: C1=3%, C2=5% and C3=7%, with high antioxidant capacity and inhibitory effect on microorganisms, notably observing the decrease in antimicrobial activity due to the use of polyphenols as a natural preservative in foods without treatment, allowing the predominant microorganisms to be reduced.

In the colony count, a control of raw milk microorganisms was carried out without the presence of phenols with 510 CFU, and other samples evaluated with the presence of phenols in microorganisms predominant in E. Coli: C1=91 CFU, C2=65 CFU and C3=42 CFU with effect inhibitor in C1=82%, C2=87% and C3=92%; mesophilic aerobes: C1=75CFU, C2=63CFU and C3=45CFU with inhibitory effect on C1=85%, C2=88% and C3=91%, and molds and yeasts: C1=240CFU, C2=192CFU and C3=136CFU with inhibitory effect on C1=53%, C2=62% and C3=73%.

**Key words:** Phenolic compounds, Folin Ciocalteu, DNS, polyphenols, CLAE, antioxidant capacity, antimicrobial growth.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	7
INDICE GENERAL.....	9
INDICE DE TABLAS.....	12
INDICE DE FIGURAS.....	13
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
1. MARCO TEORICO.....	18
1.1 Origen del cacao.....	18
1.2 Cacao.....	19
1.2.1 <i>Taxonomía del cacao.</i> ....	20
1.2.2 <i>Composición química del cacao.</i> ....	21
1.2.3 <i>Calidad del cacao.</i> ....	21
1.2.4 <i>Fruto de cacao.</i> ....	22
1.2.5 <i>Genotipos o variedades del cacao.</i> ....	23
1.2.5.1 <i>Nacional.</i> ....	23
1.2.5.2 <i>Criollo.</i> ....	24
1.2.5.3 <i>Forastero.</i> ....	24
1.2.5.4 <i>Trinitario.</i> ....	24
1.2.5.5 <i>CCN-51.</i> ....	24
1.3 Polifenoles.....	26
1.3.1 <i>Perfil de Polifenoles.</i> ....	27
1.3.2 <i>Polifenoles en la salud.</i> ....	27
1.4 Flavonoides.....	28

1.5	Compuestos Fenólicos .....	28
1.6	Capacidad Antioxidante.....	30
1.6.1	<i>Antioxidante enzimático.</i> .....	30
1.6.2	<i>Antioxidantes no enzimáticos.</i> .....	31
1.7	Sustancias Bioactivas.....	31
1.7.1	<i>Microencapsulación de compuestos bioactivos.</i> .....	31
1.8	Leche.....	32
1.9	Fundamento de los Métodos y Técnicas de Análisis .....	33
1.9.1	<i>Cromatografía líquida de alta eficiencia.</i> .....	33
1.9.2	<i>Espectrofotometría UV-Vis.</i> .....	34
1.9.3	<i>Método de Folin Ciocalteu.</i> .....	34
1.9.4	<i>Liofilización.</i> .....	35
1.9.5	<i>Crecimiento microbiano.</i> .....	37
2	METODOLOGIA.....	38
2.1	Sujeto de Análisis.....	38
2.1.1	<i>Población.</i> .....	38
2.1.2	<i>Muestra.</i> .....	38
2.1.3	<i>Fuentes de recolección de datos información.</i> .....	39
2.2	Identificación de Variables.....	40
2.2.1	<i>Variable dependiente.</i> .....	40
2.2.2	<i>Variable independiente.</i> .....	40
2.3	Equipos, Materiales y Reactivos.....	41
2.3.1	<i>Materiales de laboratorio.</i> .....	41
2.3.2	<i>Equipos de laboratorio.</i> .....	41
2.3.3	<i>Reactivos.</i> .....	42
2.4	Diseño Metodológico y Procedimiento.....	42
2.4.1	<i>Tratamiento.</i> .....	42
2.4.2	<i>Extracción de compuestos fenólicos por liofilización.</i> .....	43
2.4.3	<i>Cuantificación de Fenoles Totales por el método de Folin Ciocalteu.</i> .....	43
2.4.4	<i>Cuantificación de Azúcares reductores por el método de DNS.</i> .....	45
2.4.5	<i>Determinación de Componentes Fenólicos por CLAE-MS.</i> .....	46
2.4.6	<i>Determinación de capacidad antioxidante por DPPH.</i> .....	46
2.4.7	<i>Determinación de capacidad antimicrobiana.</i> .....	47
2.4.7.1	<i>Evaluación en E. coli totales.</i> .....	47

2.4.7.2 Evaluación de aerobios mesófilos. ....	48
2.4.7.3 Evaluación de mohos y levaduras. ....	48
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	49
3.1 Extracción de compuestos fenólicos en las almendras de cacao.....	49
3.2 Correlación del contenido de compuestos fenólicos totales y azúcares reductores. .	53
3.3 Correlación del contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante. .....	54
3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana en leche cruda .....	55
3.5 Análisis cromatográficos de compuestos fenólicos .....	56
CAPITULO 4 .....	60
CONCLUSIONES .....	60
CAPITULO 5 .....	61
RECOMENDACIONES .....	61
BIBLIOGRAFÍA .....	62
ANEXOS .....	71

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del Cacao .....	20
Tabla 2. Componentes del cacao en 100 gramos en base seca.....	21
Tabla 3. Composición química en 100 g de cacao en base seca .....	21
Tabla 4. Requisitos Técnicos del Cacao CCN-51 .....	25
Tabla 5. Análisis proximal del cacao .....	25
Tabla 6. Identificación de muestras .....	43
Tabla 7. Preparación de muestras de cacao %p/v .....	47
Tabla 8. Identificación de componentes fenólicos .....	57

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Semillas viables (arriba) y no viables (abajo) de la almendra de cacao .....	20
Figura 2. Partes del Cacao .....	22
Figura 3. Genotipos del Cacao .....	23
Figura 4. Corte anatómico del grano de cacao, señalando componentes celulares.....	26
Figura 5. Estructura química de compuestos fenólicos simples.....	29
Figura 6. Clasificación de compuestos fenólicos según el número de subunidades de fenol la jerarquía de los flavonoides comunes monómeros y polímeros.....	29
Figura 7. Mecanismo de actividad de antioxidantes de los polifenoles .....	30
Figura 8. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia.....	33
Figura 9. Espectrofotómetro UV-Visible.....	34
Figura 10. Oxidación de polifenoles en ensayo de Folin-Ciocalteu. Procedimiento basado en la transferencia de electrones en un entorno básico, mediante sustancias reductoras	35
Figura 11. Liofilizador de vacío para Laboratorio .....	36
Figura 12. Etapas del secado por Liofilización.....	36
Figura 13. Láminas Petrifilm para recuento de Colonias: 1) Echerichia Coli, 2) Anaerobios Mesófilos, 3) Mohos y levaduras .....	37
Figura 14. Curva de Calibración EAG.....	44
Figura 15. Curva de Calibración EAT .....	45
Figura 16. Liofilización del cacao en agua esteril.....	49
Figura 17. Liofilización del cacao en relación etanol-agua 70:30 .....	50
Figura 18. Liofilización del cacao en relación etanol-agua 50:50 .....	51
Figura 19. Liofilización del cacao en relación etanol puro .....	52
Figura 20. Contenido de C.F.T y A.R.....	53
Figura 21. Correlación del contenido de C.F.T y actividad antioxidante.....	54
Figura 22. Actividad antimicrobiana: mohos y levaduras (MyL), aeróbios mesófilos (AE), E. coli (EC). .....	55
Figura 23. CLAE-EM de los compuestos fenólicos .....	56
Figura 24. Espectro m/z a la concentración de componentes fenólicos .....	57
Figura 25. CLAE-EM analizados de las almendras de cacao en una disolución esteril.....	57

## LISTADO DE ABREVIATURAS

- ICCO:** Organización Internacional del Cacao.
- CCN-51:** Colección Castro Naranjal.
- CLAE:** Cromatografía líquida de alta eficiencia.
- DPPH:** 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo.
- DNS:** Acido 3-5 Dinitro-salicílico.
- UV-Vis:** Ultravioleta visible.
- C.F.T:** Compuestos fenólicos totales.
- A.R:** Azucares Reductores.
- ERO:** Especies reactivas de oxígeno.
- GSH-PX:** Glutación peroxidasa.

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma Cacao*) es un árbol perenne, siendo un cultivo con una alta relevancia económica y muy significativa para numerosos países en desarrollo, encontrados en África, América Latina y Asia según datos de la ICCO pertenecientes al año 2023, la producción global de cacao en grano se calculó en aproximadamente 4.9 millones de toneladas durante el período 2022-2023.<sup>1</sup>

Ecuador contribuye con el 8% de la producción global con 400,000 toneladas en conjunto, aportando el 50% de la oferta global en la producción única y exclusiva de cacao fino; en el 2023, alcanzando una cifra récord de exportación y posee el potencial para incrementar su participación mediante un aumento en la producción.<sup>1</sup>

El cultivo del cacao es muy importante en todo el mundo, particularmente en las naciones tropicales. Esta especie crece bajo sombra en varios agro-ecosistemas, principalmente de árboles frutales. En Ecuador, las regiones más importantes para la producción de cacao son El Oro, Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas y Santo Domingo de los Tsáchilas. Además, 600 mil familias están involucradas en su cultivo, lo que representa el 4,3% de la población económicamente activa.<sup>2</sup>

Aunque Ecuador es conocido por ser el principal productor de cacao nacional, también se cultiva la variedad CCN-51 debido a su menor susceptibilidad a enfermedades y a su mayor rendimiento por unidad de superficie, siendo diferenciado y reflejado en calidad y productividad al precio internacional, siendo el cacao nacional más caro que el CCN-51. Dadas estas disparidades, se entiende que en ciertos casos se mezclen granos de cacao nacional con granos de cacao CCN-51, sin embargo, esta adulteración plantea serias complicaciones tanto para el país exportador como para los fabricantes de chocolate.<sup>3</sup>

Los compuestos fenólicos son de origen natural y están presentes en las plantas, que tienen la función de protegerlas contra ataques de microorganismos y atraer insectos polinizadores, entre otros roles que facilitan su interacción con el medio ambiente circundante. Por ejemplo, el árbol *Theobroma cacao* produce frutos con un alto contenido de polifenoles, especialmente antioxidantes como catequinas y epicatequinas, similares a los que se encuentran en vegetales y té.<sup>4</sup>

Las almendras del *Theobroma cacao* poseen un alto contenido de polifenoles, y su uso como antioxidante natural puede extender la vida útil de productos procesados con un crecimiento antimicrobiano muy considerable, ofreciéndose como alternativa para el aprovechamiento del cacao, permitiendo generar nuevos ingresos para los productores, siendo una fuente valiosa para la elaboración de productos alimenticios con beneficios funcionales.<sup>4</sup>

Estos polifenoles presentes en el cacao son muy beneficiosos para reducir la oxidación de lípidos y proteínas en los alimentos procesados o en productos que durante su elaboración sean usados como conservante natural. Su acción consiste en proteger los ácidos grasos poliinsaturados de la peroxidación, tanto en las membranas celulares como en las lipoproteínas de baja densidad.<sup>4</sup>

Mediante los métodos de Espectrofotometría UV-VIS y CLAE-EM, permitió cuantificar e identificar los compuestos fenólicos y componentes encontrados durante los ensayos experimentales respectivamente, así como también la determinación de la capacidad antioxidante y evaluación antimicrobiana de la leche cruda con el objetivo de verificar su efecto inhibitor en los alimentos procesados o en alimentos en donde se pueda aplicar como un conservante natural.

La presente investigación trata en cuantificar los compuestos fenólicos presentes en las almendras de cacao de la variable CCN-51, que ayudaría a evidenciar los efectos beneficiosos que posee este fruto al ser aplicados y evaluados en la leche cruda.

## **OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en las almendras de cacao mediante espectrofotometría UV-Vis y CLAE-EM y su aplicación como conservante natural.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Extraer los compuestos fenólicos presentes en la almendra de cacao mediante liofilización con la ayuda de solventes orgánicos como etanol y agua en diferentes relaciones.
- Cuantificar los compuestos fenólicos obtenidos en el liofilizado mediante espectrofotometría UV-Vis y CLAE-EM.
- Aplicar el extracto polifenólico en leche cruda evaluando su capacidad antioxidante y antimicrobiana.

## CAPITULO 1

### 1. MARCO TEORICO

#### 1.1 Origen del cacao

El género *Theobroma*, que en griego significa "alimento de los dioses", se originó hace millones de años en América del Sur, específicamente al este de Los Andes. De las veintidós especies, la más conocida es la *Theobroma cacao*. Evidencias arqueológicas recientes encontradas al sur de Ecuador indican que los granos de cacao eran utilizados hace más de 5.300 años por poblaciones nativas, incluso antes de la domesticación del árbol, que ocurrió unos 1.500 años después.<sup>5</sup>

Desde entonces, las semillas de cacao fueron utilizadas por varias civilizaciones precolombinas, como los mayas, incas y aztecas, tanto como alimento, como moneda de intercambio y en rituales. El primer europeo en probar el chocolate fue Cristóbal Colón, quien llegó a Nicaragua en 1502 en busca de una ruta marítima hacia las especias de Oriente. Sin embargo, fue Hernán Cortés, líder de una expedición al imperio azteca en 1519, quien llevó la receta del Xocoatl (bebida de chocolate) de regreso a España en 1528.<sup>5</sup>

Inicialmente, la bebida no fue muy bien recibida, pero se volvió popular en las cortes españolas y europeas cuando se le añadió azúcar. Para satisfacer la creciente demanda europea, el cultivo de cacao se extendió lentamente durante el período de colonización a las tres principales zonas productoras de cacao en la actualidad: Asia, África, América Latina y el Caribe<sup>5</sup>.

Desde su origen en América Central, el *Theobroma cacao* se ha cultivado principalmente mediante la obtención de grano, que representa aproximadamente un 10% del peso del fruto fresco.<sup>6</sup>

La industrialización del cultivo del cacao en su conjunto, incluyendo los desechos agroindustriales de la cosecha como cáscaras, aguas mieles, grasas, entre otros, ha sido un camino hacia el desarrollo de productos innovadores, que presenten una alta demanda en el mercado nacional e internacional. Además, se han convertido en la materia prima ideal para las industrias que aportan valor a estos subproductos y además son una alternativa de solución a la problemática de la falta de valor en los derivados.<sup>6</sup>

## **1.2 Cacao**

El cacao es un árbol que crece en climas tropicales en América del Sur.<sup>7</sup> Las almendras de cacao, semillas de varios tipos, se utilizan para hacer chocolate y sus derivados en el mercado nacional e internacional y se han convertido en la materia prima ideal para las industrias que aportan valor a estos subproductos y también son una alternativa de solución a los problemas ambientales causados por este foco de contaminación.<sup>8</sup>

Dependiendo de cómo se cuide, este árbol puede llegar a una altura de entre 4 y 10 mt y puede producir de 12 a 20 mazorcas durante la época de cosecha. Las mazorcas, que varían según el tipo de cacao, tienen una forma redondeada y alargada, algunas veces arrugada, y contienen hasta 60 semillas, llamadas almendras, envueltas en mucílago blanco.<sup>8</sup>

Debido a la necesidad de ciertos factores, como las altas temperaturas, para que este tipo de árbol crezca en climas tropicales, necesita un cuidado constante para garantizar una producción suficiente de mazorcas.<sup>7</sup>

Las semillas, también conocidas como almendras, están rodeadas por una cáscara llamada testa y luego por un cotiledón que, dependiendo del tipo de cacao, puede tener un sabor dulce o ácido. Estas semillas tienen un color oscuro, a veces morado, una forma alargada, redondeada o plana y una longitud de 2 a 3 cm. También son ricas en proteínas, grasas y almidón, lo que les da un alto valor nutricional.<sup>9</sup>

**Figura 1.** Semillas viables (arriba) y no viables (abajo) de la almendra de cacao



**Fuente:** <sup>9</sup>

1.2.1 *Taxonomía del cacao.* La especie *Theobroma Cacao*, perteneciente a la familia *Malvaceae*, recibe su nombre científico por ser una planta perenne.<sup>10</sup>

En la Tabla 1 se presenta la taxonomía general del cacao.

**Tabla 1.** Taxonomía del Cacao

Taxonomía del Cacao	
<b>Clase</b>	Angiosperma
<b>Subclase</b>	Dicotyledoneae
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Malvaceae
<b>Genero</b>	Teobroma

**Fuente:**<sup>10</sup>

1.2.2 *Composición química del cacao.* Resulta ser compleja en la almendra de cacao y subproductos del mismo, ya que depende del proceso y el cuidado aplicado a las plantaciones durante la etapa de crecimiento. Para una mejor comprensión, en la Tabla 2 se presentan los componentes del cacao en base seca, mientras que en la Tabla 3 se muestra la composición química en 100 gramos de cacao en base seca.<sup>10</sup>

**Tabla 2.** Componentes del cacao en 100 gramos en base seca

<b>Bioelemento</b>	<b>Contenido</b>	<b>Bioelemento</b>	<b>Contenido</b>
Calorías	456	Fósforo	537 mg
Agua	3,6 ml	Calcio	106 mg
Proteína	12 g	Tiamina	0,17 – 0,24 mg
Grasa	46,3 g	Riboflavina	0,14 – 0,41 mg
Carbohidratos	34,7 g	Niacina	1,7 mg
Fibra	8,6 g	Ácido Ascórbico	3,0 mg
Glucosa	8 – 13 g	Piridina	0,9 mg
Sacarosa	0,4 – 0,9 g	Hierro	3,6 mg

**Fuente:**<sup>10</sup>

**Tabla 3.** Composición química en 100 g de cacao en base seca

<b>Bioelemento</b>	<b>% Máximo de grano sin cascara</b>	<b>% Máximo de cáscara</b>
Agua	3.2	6.6
Grasa	57	5.9
Nitrógeno total	2.5	3.2
Cafeína	0.7	0.3
Almidón	9	5.2
Fibra Cruda	3.2	19.2

**Fuente:**<sup>10</sup>

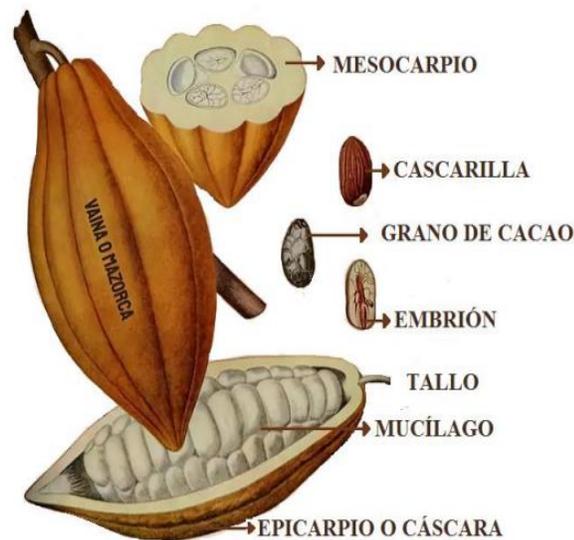
1.2.3 *Calidad del cacao.* El cacao es una materia prima utilizada para obtener subproductos como licor, manteca y cacao en polvo, así como productos finales como el chocolate.<sup>7</sup>

Se han identificado dos especies de cultivo en relación a su calidad: el cacao Criollo que se encuentra en Centroamérica, y el cacao Trinitario que es considerado para la producción mundial de cacao debido a su resistencia.<sup>11</sup>

Gracias a sus condiciones climáticas y geográficas, Ecuador es reconocido como productor mundial de cacao fino de aroma, ya que las almendras se comercializan semielaborados y elaborados, destacándose por su alta calidad y aroma, permitiendo cumplir ciertos reglamentos para la exportación del cacao, incluyendo los límites permisibles de concentración de metales pesados en las almendras, ya que una alta concentración podría representar un riesgo para los consumidores y afectar la economía del país, especialmente en países con estrictos reglamentos de calidad alimentaria como los europeos.<sup>12</sup>

*1.2.4 Fruto de cacao.* El fruto del cacao comúnmente se llama mazorca; puede ser de color verde o rojizo cuando está inmaduro y de color naranja o amarillo cuando está maduro. Presenta una cáscara gruesa, su fruto consta de cuatro partes importantes: la cáscara representa el 56% del peso total de la mazorca madura; el mucílago cubre los granos de cacao en el interior de la mazorca, las semillas se encuentran rodeadas por esta pulpa aromática con forma de almendras aplanadas existiendo entre 30 y 50 semillas por mazorca, y la cascarilla del grano de cacao es la cubierta exterior de color marrón.<sup>13</sup>

**Figura 2. Partes del Cacao**

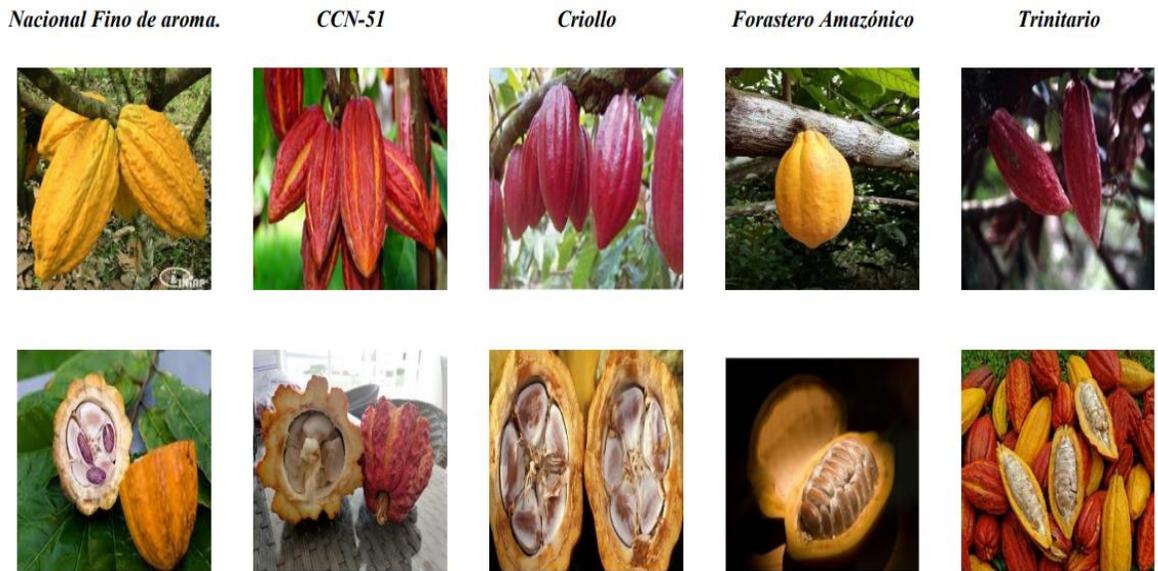


**Fuente:**<sup>14</sup>

1.2.5 *Genotipos o variedades del cacao.* El árbol cacaotero presenta más de 14,000 grupos genéticos distintos, siendo sus variedades principales el Forastero, Criollo, Trinitario, la variable CCN-51 y nacional del Ecuador.<sup>15</sup>

Las variedades de cacao pueden diferenciarse por las características morfológicas de sus frutos, origen geográfico, así como por las características de sabor y aroma. En este sentido, el genotipo juega un papel crucial, ya que influye en la apariencia (forma, color, textura superficial), composición (volátil o no volátil) y calidad organoléptica (sabor, olor, color) de la almendra de cacao.<sup>16</sup>

**Figura 3.** Genotipos del Cacao



**Fuente:** Autor

1.2.5.1 *Nacional.* Es una variedad de cacao de excelente calidad, considerada única en el mundo debido a sus características aromáticas muy perceptibles y particulares. El cacao Nacional es muy distintivo y diferente, descrito como un sabor floral fuerte con matices de astringencia, notas de leguminosas verdes y flores cítricas dejando una sensación de frescura que llena la boca y desaparece rápidamente.<sup>16</sup>

*1.2.5.2 Criollo.* Se encuentra actualmente en América Central, Venezuela y en algunas regiones de Asia. Sus mazorcas son de color amarillo o rojo, con una textura rugosa, las semillas son grandes y redondeadas, con cotiledones de color blanco o púrpura muy pálido.<sup>16</sup>

Esta variedad presenta una escasa variabilidad genética, con un aroma frutal-floral ligeramente amargo, con notas de frutos secos, como un sabor a chocolate delicado pero refinado. A pesar de su excepcional calidad debido a su aroma distintivo, es la variedad menos fructífera y la más susceptible a enfermedades e insectos siendo la menos cultivada.<sup>16</sup>

*1.2.5.3 Forastero.* Proviene de la cuenca amazónica y se cultiva principalmente en América Central, Las Antillas, Brasil y, sobre todo, en África Occidental. Se caracteriza por tener una calidad ordinaria, pero ofrece un excelente rendimiento y resistencia a las enfermedades. Tiene un aroma poco pronunciado, es astringente y presenta un sabor muy intenso a chocolate, que lo distingue de otras variedades de cacao. Sus frutos son de color amarillo, lisos, con semillas pequeñas y planas, y cotiledones son de color violeta.<sup>16</sup>

*1.2.5.4 Trinitario.* Desarrollado en Trinidad y Tobago; extendido a países como Venezuela, Ecuador y Sri Lanka, entre otros países, es un híbrido natural entre el cacao Criollo y Forastero. Presenta propiedades intermedias en cuanto a morfología, niveles de producción, características gustativas y olfativas, así como resistencia a enfermedades y plagas. Se caracteriza por su calidad, buen rendimiento y un aroma interesante debido a sus notas frutales achocolatadas. Además, posee un sabor a vino que lo distingue de otros tipos de cacao.<sup>16</sup>

*1.2.5.5 CCN-51.* Pertenece a la familia *Esterculaceae* y es un árbol de pequeña estatura, que puede alcanzar una altura de aproximadamente 2.50 metros y produce alrededor de 250 mazorcas por árbol. Este tipo de cacao es el resultado de varios años de investigación en hibridación de plantas, en la ciudad de Naranjal, provincia del Guayas, en el año 1965, llevada a cabo de manera exitosa por Homero Castro Zurita, un investigador originario de Ambato, logrando desarrollarse lo que se conoce actualmente como cacao Clonal CCN-51, que significa Colección Castro Naranjal.<sup>16</sup>

**Tabla 4.** Requisitos Técnicos del Cacao CCN-51

Requisitos	Unidad	CCN-51
100 granos pesas	G	135-140
Buena fermentación (min)	%	Aprox. 65
Ligera fermentación (min)	%	11
Violeta (max)	%	18
Pizarroso (max)	%	5
Moho	%	1

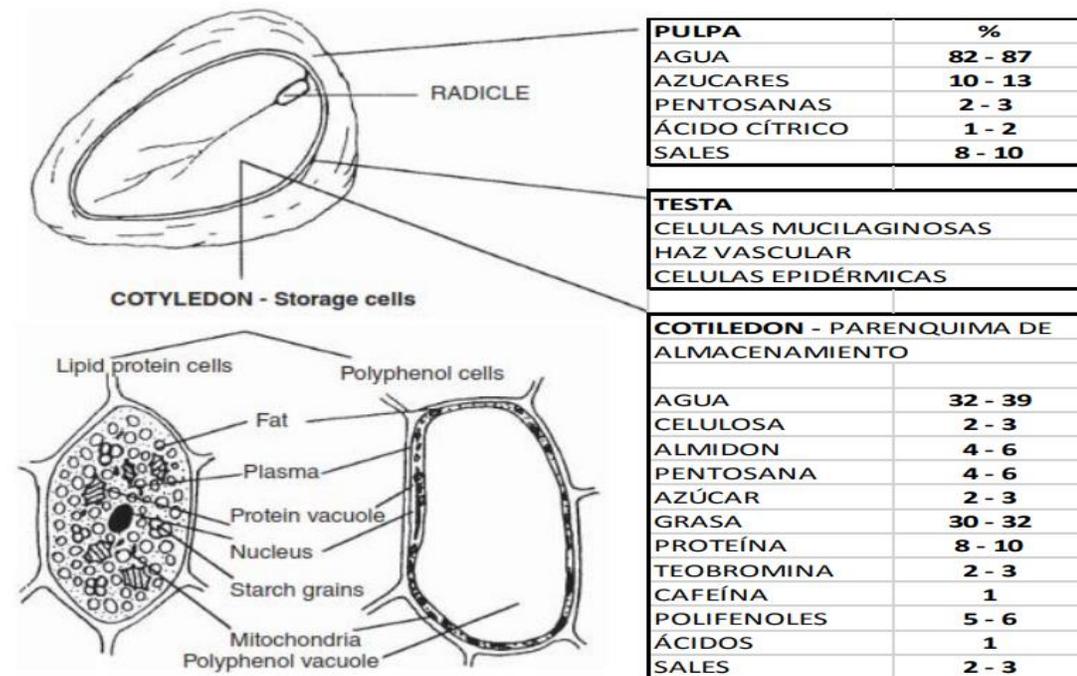
**Fuente:**<sup>18</sup>

**Tabla 5.** Análisis proximal del cacao

Trat. De cacao	Variable					
	Humedad (%) <sup>*</sup>	Proteína cruda (%) <sup>*</sup>	Grasa cruda <sup>*</sup> (%)	Ceniza (%) <sup>*</sup>	Carbohidratos totales (%) <sup>*</sup>	Fibra cruda (%) <sup>*</sup>
<b>Nacional Ecuador</b>	6.03 ± 0.10 a	8.60 ± 0.20 c	50.87 ± 0.19 a	2.23 ± 0.08 bc	32.28 ± 0.46 a	4.64 ± 0.47 c
<b>CCN 51 Ecuador</b>	6.00 ± 0.09 a	8.08 ± 0.25 d	51.02 ± 0.24 a	2.73 ± 0.08 a	32.17 ± 0.11 a	4.28 ± 0.01 c

**Fuente:**<sup>8</sup>

**Figura 4.** Corte anatómico del grano de cacao, señalando componentes celulares



Fuente:<sup>17</sup>

### 1.3 Polifenoles

Los polifenoles dependiendo a su complejidad química y a la forma de agrupación como C<sub>6</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>n</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>n</sub>-C<sub>6</sub>, constituyen el conjunto más extenso de compuestos no energéticas que se encuentran en los alimentos derivados de las plantas. Su efecto beneficioso en la salud, se debe a que estos compuestos tienen la capacidad de modular la actividad de diversas enzimas e intervenir en procesos celulares llegando a participar en varias reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción, lo que les otorga el nombre de antioxidantes.<sup>18</sup>

Hay diversas categorías y subcategorías de polifenoles que se clasifican en función de la cantidad de anillos fenólicos y sus características estructurales que se encuentran en dichos anillos. Los grupos más destacados que se definen según el número de anillos fenólicos que poseen y los elementos estructurales presentes en estos anillos. Los grupos más destacados de polifenoles son los ácidos fenólicos (provenientes del ácido hidroxibenzoico o ácido hidroxixinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides.<sup>18</sup>

Las catequinas son el tipo más común de compuestos flavan-3-ol presentes en muchas plantas alimenticias contribuyendo un efecto astringente en la boca, que se experimenta especialmente, después de consumir cacao o chocolate, té, arándanos y vino.<sup>19</sup>

Las antocianinas se encuentran abundantemente en alimentos de origen vegetal, encargados de la coloración de flores y frutos. En el caso de los vinos envejecidos ligado a taninos, son los que determinan el color rojo, debido a su capacidad para proporcionar color, siendo aplicados en la industria alimentaria como colorantes naturales, identificados con el código E169.<sup>19</sup>

Los taninos son componentes del grupo de las proantocianidinas, y tienen estructuras poliméricas compuestas por la unión de flavonoides, se encuentran en gran abundancia en la naturaleza, formando mezclas complejas; quienes son encargados de color, textura y el sabor áspero y astringente, presentes en ciertos alimentos como por ejemplo el chocolate, café y té.<sup>20</sup>

*1.3.1 Perfil de Polifenoles.* El término "perfil de polifenoles" se refiere a la descripción del tipo de polifenoles en las almendras de cacao, representando hasta el 20 % de su masa. Los polifenoles más comunes en el cacao son los flavan-3-oles, que constituyen el 37% de ellos. Dentro de este grupo, se destacan la Epicatequinas, que representa el 35%, y los oligómeros que constituyen el 58% están formados por la unión de varios monómeros, como la (+)-Epicatequinas y la (-)-Epicatequina, conocidos como Procianidinas.<sup>20</sup>

*1.3.2 Polifenoles en la salud.* El consumo de cacao y derivados ha suscitado un creciente interés en los últimos años debido a los efectos beneficiosos para la salud, atribuidos a su alto contenido de polifenoles.<sup>21,22</sup>

Diversas investigaciones epidemiológicas han evidenciado la relación entre la ingesta de polifenoles en la comida y la prevención de diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, procesos cancerígenos, entre otros, así como la actividad desinflamatoria, la reducción del colesterol total y de la lipoproteína de baja densidad.<sup>21,22</sup>

## 1.4 Flavonoides

Los flavonoides (2-Fenilcromona; fenil-4-H-1-benzopirano-4-ona:  $C_{15}H_{10}O_2$ ) son compuestos producidos como metabolitos secundarios por las plantas, que comparten un elemento estructural común: Un esqueleto de difenilpirano que está formado por un anillo de fenilo A y otro anillo designado fenilo B, que están adheridos a un anillo de pirano C, con la fórmula  $C_6-C_3-C_6$ . Sobre este esqueleto básico pueden ocurrir numerosas sustituciones, lo que da lugar a las diversas clases de flavonoides, que incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, chalconas, auronas e isoflavonas.<sup>23</sup>

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y se encuentran en cantidades variables en diversos alimentos como frutas rojas (fresas, moras), cítricos, verduras, semillas (nueces), especias y varias plantas medicinales. También están presentes en bebidas derivadas de vegetales, como el té, infusiones, mosto, cacao, zumos y vino.<sup>23</sup>

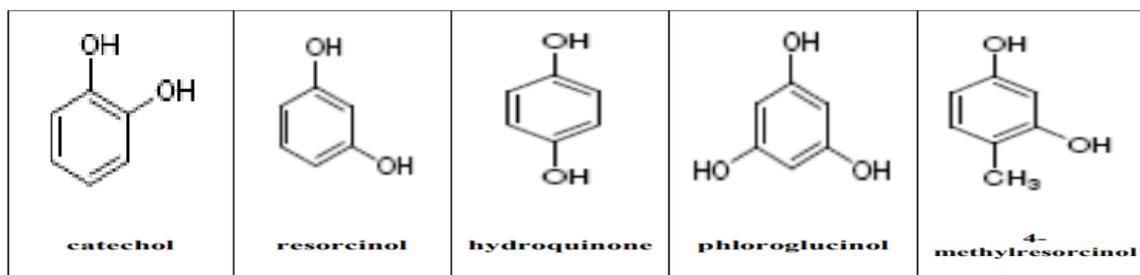
## 1.5 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos de micronutrientes más relevantes en la dieta alimentaria; poseen una estructura química propicia para desempeñar funciones antioxidantes y pueden encontrarse en diferentes formas, sea natural, combinados con ésteres o azúcares, unidos a proteínas y polisacáridos, o en forma de polímeros, asociados principalmente con características sensoriales, como color, sabor y astringencia, en una amplia gama de alimentos.<sup>24</sup>

Los fenoles son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas como resultado de su metabolismo secundario, esenciales para el funcionamiento normal de las plantas; otros compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en los mecanismos de defensa contra situaciones de estrés y el ataque de organismos patógenos.<sup>24</sup>

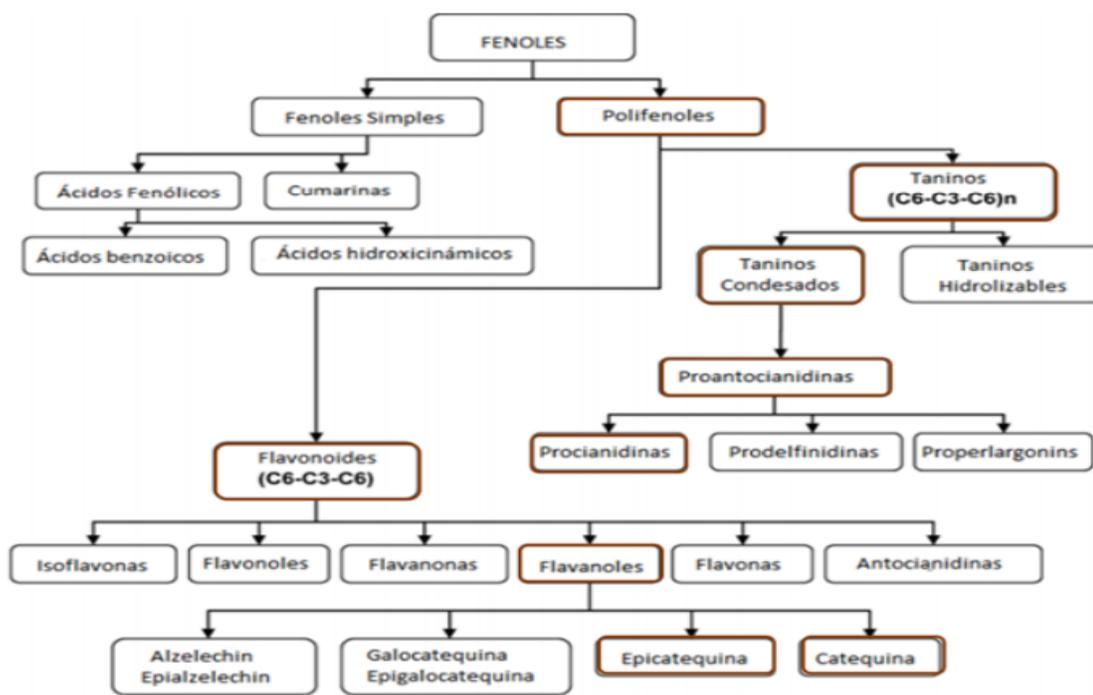
Los fenoles simples son sustancias que tienen dos o tres grupos hidroxilo en el anillo aromático, situados en las posiciones 1,2; 1,3 o 1,4; así como también en las posiciones 1,3,5 o 1,2,3. Se derivan del resorcinol y tienen propiedades anfifílicas que se encuentran principalmente en muchos cereales; además de sus propiedades antioxidantes, se ha evidenciado que los compuestos fenólicos poseen una importante actividad biológica, incluyendo propiedades antibióticas o antiparasitarias.<sup>19</sup>

**Figura 5.** Estructura química de compuestos fenólicos simples



Fuente:<sup>19</sup>

**Figura 6.** Mapa conceptual de compuestos fenólicos.



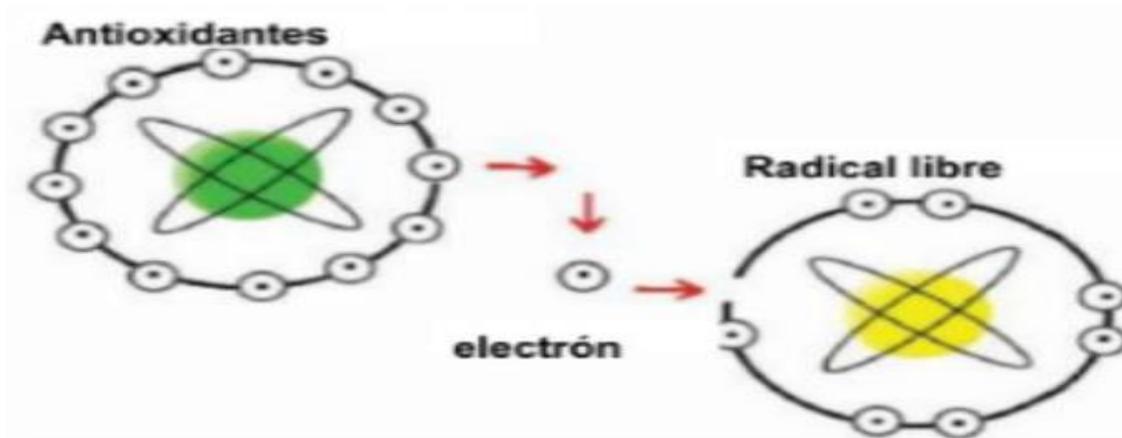
Fuente:<sup>24,25</sup>

## 1.6 Capacidad Antioxidante

El organismo crea un sistema de defensa con agentes antioxidantes para contrarrestar los radicales libres.<sup>24</sup> La actividad de una molécula para retrasar o evitar la oxidación de otras moléculas se conoce como capacidad antioxidante. Al interactuar con un radical libre, estos agentes antioxidantes ceden un electrón, oxidándose ellos mismos y convirtiéndose en un radical libre débil y no tóxico.<sup>26</sup>

Entre sus funciones principales se incluye la prevención de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), además de reparar o eliminar el daño oxidativo. Esto aumenta la resistencia a los ataques oxidativos y contribuye a la transformación de metabolitos reactivos en moléculas menos reactivas.<sup>26</sup>

**Figura 7.** Mecanismo de actividad de antioxidantes de los polifenoles



**Fuente:**<sup>26</sup>

**1.6.1 Antioxidante enzimático.** Las defensas antioxidantes se basan en la prevención de la disminución de oxígeno univalente a través de enzimas sistemáticas. Se han identificado varios tipos de enzimas especializadas en desactivar las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) por diversos mecanismos, entre estas se incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GSH-PX), entre otras, desempeñando un papel crucial en la neutralización de los radicales libres y en la protección contra el estrés oxidativo.<sup>27</sup>

1.6.2 *Antioxidantes no enzimáticos*. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran el glutatión (GSH) en su forma reducida, minerales como selenio y zinc, y vitaminas como la riboflavina, vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que desempeñan un papel fundamental en la protección contra el daño oxidativo al actuar como cofactores de las enzimas antioxidantes participando directamente en la neutralización de radicales libres.<sup>27</sup>

## 1.7 Sustancias Bioactivas

Son sustancias presentes en los alimentos, tanto esenciales como no esenciales, que se producen en mínimas cantidades, tienen efectos beneficiosos para la salud humana; pueden tener propiedades antiinflamatorias contribuyendo a la prevención de enfermedades cardiovasculares, entre otros efectos en el organismo humano.<sup>28</sup>

1.7.1 *Microencapsulación de compuestos bioactivos*. La Microencapsulación (ME) es una técnica empleada para encapsular ingredientes alimentarios en diminutas cápsulas. Esta técnica se utiliza en la industria alimentaria con el propósito de preservar el contenido nutricional, como antioxidantes y vitaminas, y facilitar una liberación controlada de sabores, aromas y agentes acidulantes en los alimentos permitiendo una liberación precisa de aditivos, garantizando una dosis óptima y mejorando la rentabilidad para los fabricantes de alimentos.<sup>29</sup>

La aplicación de la técnica de Microencapsulación ha ido en aumento en la industria alimentaria debido a la protección que proporciona a los materiales encapsulados frente a factores como el calor y la humedad, lo que permite mantener su estabilidad y viabilidad. Además, la encapsulación de enzimas y microorganismos facilita su manejo, reutilización y recuperación a gran escala en los procesos industriales.<sup>30</sup>

## 1.8 Leche

Es un producto extraído de la secreción de la glándula mamaria obtenido por varios ordeños en animales bovinos sanos; se puede considerar como un excelente alimento porque contiene diversos componentes que son muy importantes para la nutrición, pues como es de conocimiento, durante una de las fases del desarrollo es muy consumida e importante; sin embargo, hay que tener en cuenta que en este alimento se estima que es un cultivo muy nutritivo en microorganismos benéficos como lo es para las bacterias destructoras y patógenas, cuyo crecimiento dependerá de los metabolitos presentes y en especial de la temperatura.<sup>31</sup>

Según el INEN, la leche cruda es aquel alimento que no ha sido tratado térmicamente (no más de 40°C), exceptuando la fase de enfriamiento para su preservación por lo que no es considerado apto para el consumo humano. La leche cruda contiene un contaje de sujetos patógenos superiores al nivel permitido en la NTE INEN 9:2012 en la quinta sección.<sup>32,33</sup>

**Tabla 6.** Composición química de la leche.

<b>Composición</b>	<b>(%)</b>
<b>Agua</b>	87.5
<b>Caseína</b>	2.9
<b>Albumina</b>	4.9
<b>Alfa lactoalbumina</b>	0.5
<b>Beta lactoalbumina</b>	0.2
<b>Fosfolípidos</b>	0.1
<b>grasa</b>	3.7
<b>Ácido cítrico</b>	0.2

**Fuente:**<sup>31,32</sup>

## 1.9 Fundamento de los Métodos y Técnicas de Análisis

*1.9.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia.* Es un método analítico que se utiliza para dividir los compuestos de una mezcla orgánica con poca volatilidad, termolábiles, iónicos, y con masas moleculares relativamente altos especialmente. En el procedimiento de purificación y separación, la fase móvil lleva la muestra a través de la fase estacionaria, que generalmente es una columna de separación. Durante este recorrido, los componentes se separan según las interacciones fisicoquímicas con la fase estacionaria.<sup>34</sup>

Una vez separados, los componentes son detectados por un detector de absorbancia de luz, variaciones en el índice de refracción, cambios conductividad electroquímica, o en la repartición del tamaño de las partículas diluidas. El resultado a obtener del detector se representa en picos con su respectiva área, siendo directamente proporcional a la cantidad del componente presente. La CLAE se utiliza ampliamente en el control de calidad de alimentos, productos farmacéuticos y en otros campos donde se requiere la separación y cuantificación precisa de componentes en una muestra.<sup>34</sup>

**Figura 8. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia**



**Fuente:** Autor

1.9.2 *Espectrofotometría UV-Vis.* Es una técnica analítica que se aplica la radiación electromagnética de luz ultravioleta (UV) cercana de la región visible, e infrarroja (NIR) cercana, es decir, en un rango de longitud de onda entre 380 y 780 nm. Cuando las moléculas en solución absorben esta radiación, provocan transiciones electrónicas que pueden ser medidas y cuantificadas. Este método se emplea para determinar la concentración de compuestos altamente conjugados, así como para analizar polifenoles totales, flavonoides totales y evaluar la actividad antioxidante en muestras.<sup>35</sup>

**Figura 9. Espectrofotómetro UV-Visible**



**Fuente:** Autor

1.9.3 *Método de Folin Ciocalteu.* Se emplea este método para cuantificar polifenoles totales en muestras vegetales que trata de una reacción oxido-reducción, en la que el reactivo se reduce al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, produciendo un complejo azul muy característico ( $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ ) que tiene una absorbancia máxima a 760 nm. Este complejo se cuantifica mediante espectrofotometría, utilizando una curva de calibración previamente obtenida con ácido gálico como estándar.<sup>36,37</sup>

La intensidad del color azul formado es proporcional al contenido de compuestos fenólicos en la muestra. El reactivo de Folin-Ciocalteu consiste en una mezcla de ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo, que comprende sales sódicas de wolframio y molibdeno en un medio ácido de  $H_3PO_4$ .<sup>36,37</sup>

Este estudio se utiliza ampliamente en el análisis cuantitativo de polifenoles totales y su evaluación en las capacidades antioxidantes en alimentos vegetales y jugos de frutas, ya que esta variable suele correlacionarse estrechamente con otros métodos de medición de la actividad antioxidante.<sup>36,37</sup>

**Figura 10.** Oxidación de compuestos fenólicos totales en la prueba de Folin Ciocalteu.



**Fuente:**<sup>37</sup>

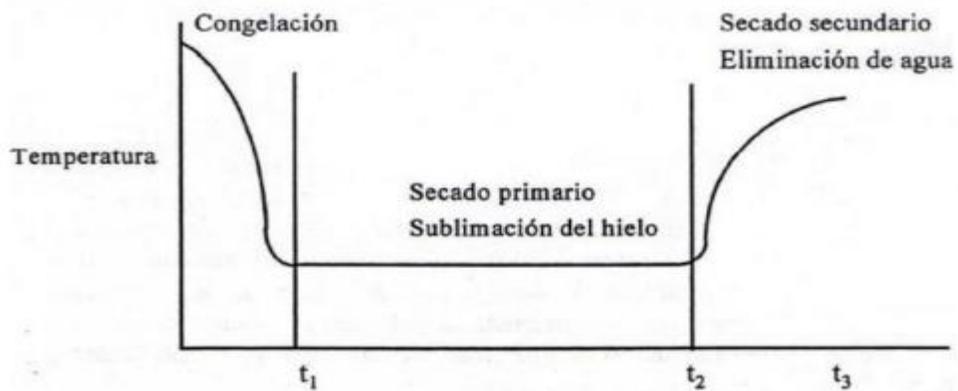
**1.9.4 Liofilización.** Es un proceso en el que las materias primas congeladas se colocan dentro de un sistema de vacío refrigerado para que se deshidraten sin descongelar. El hielo que cubre el producto se sublima y se transforma en vapor de agua. La estructura celular permanece intacta durante el proceso de liofilización. Este procedimiento ayuda a mejorar las propiedades organolépticas como color, forma, sabor y valores nutricionales de la materia prima que cualquier otro método.<sup>38</sup>

**Figura 11.** Liofilizador de vacío para Laboratorio



**Fuente:** Autor

**Figura 12.** Etapas del secado por Liofilización



**Fuente:**<sup>39</sup>

1.9.5 *Crecimiento microbiano*. Es el aumento de constituyentes celulares de manera ordenada, conduciendo al incremento de biomasa dado al número creciente de células, dadas por división celular sexual o asexual; en el caso de las bacterias, estas se dividen por fisión binaria, por lo tanto, su reproducción es asexual dando como resultado células iguales. Es muy importante indicar que existen 2 tipos de crecimiento; el individual que se basa por el ciclo celular, y el poblacional que es conocido con el nombre de colonias.

**Figura 13.** Láminas Petrifilm para recuento de Colonias: 1) *Echerichia Coli*, 2) *Aerobios Mesófilos*, 3) Mohos y levaduras



**Fuente:** Autor

## CAPITULO II

### 2 METODOLOGIA

#### 2.1 Sujeto de Análisis

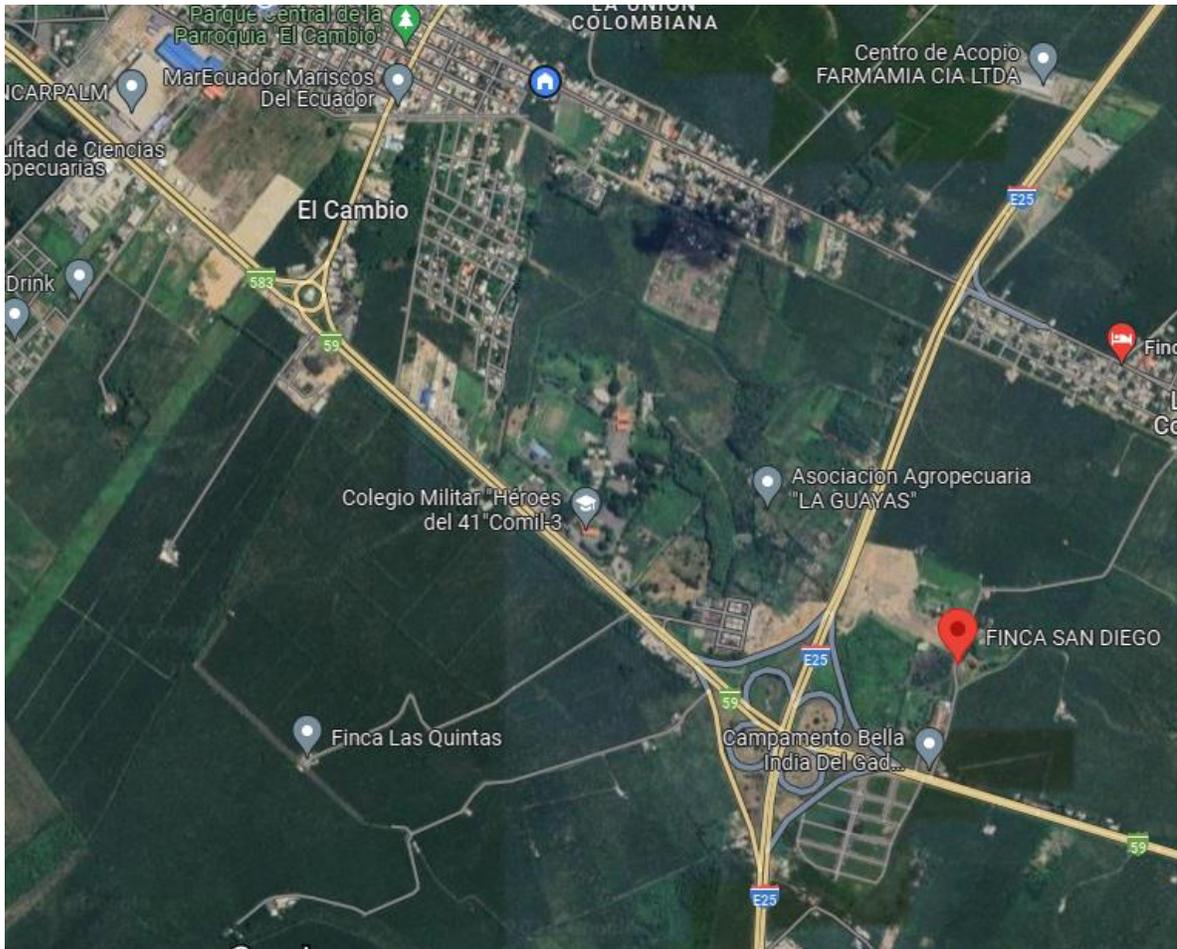
El estudio se enfocó en la cuantificación de compuestos fenólicos de la almendra de cacao utilizando un método analítico, experimental y descriptivo, con la ayuda de solventes orgánicos como el etanol con una pureza del 96% y agua en diferentes relaciones (70:30; 50:50; etanol 100% y agua 100%). Este enfoque permite analizar cómo varían los niveles de compuestos fenólicos en función de diferentes técnicas de extracción aplicadas en varias etapas del proceso. Se comparó esta variabilidad con los estándares internacionales de calidad para determinar la eficacia y la idoneidad de los métodos de extracción utilizados.

En el contexto de la extracción de compuestos fenólicos de la almendra de cacao con el propósito de aplicarlos y evaluarlos en leche cruda, la metodología descriptiva es crucial para proporcionar una caracterización detallada de los compuestos fenólicos extraídos y para contextualizar la magnitud de su potencial impacto en los alimentos sin que hayan sido tratados químicamente, como en el caso de la leche cruda.

*2.1.1 Población.* La población tomada para el presente trabajo de investigación fueron las mazorcas de cacao de la variable CCN-51, seleccionadas de la Finca San Diego, en el cantón Machala, provincia de El Oro, de coordenadas (-3.30447, -79.88248).

*2.1.2 Muestra.* Las mazorcas de cacao fueron recolectadas y trasladadas a las instalaciones de los laboratorios pertenecientes a la Universidad Técnica de Machala. Para la recolección de las muestras se seleccionó el cacao en su estado de madurez, óptimo para separar el grano del cacao de la cascarilla y el mucilago de la almendra; siendo el grano nuestra muestra definitiva a tomar.

**Figura 14.** Ubicación geográfica de la Finca San Diego



**Fuente:** Autor

2.1.3 *Fuentes de recolección de datos información.* Se recopilaron datos durante el trabajo de investigación. Se buscó información de fuentes secundarias como libros y revistas científicas para el planteamiento del proyecto de investigación, así como también repositorios académicos para comprender el desarrollo del proyecto, donde se reportarán las tesis de grado y maestrías relacionadas con el cacao, sus derivados y residuos.

Obtenida toda la información bibliográfica, se procedió a recolectar datos de fuentes primarias mediante el trabajo de campo, que incluirá la identificación del perfil fenólico de la almendra de cacao.

Entre estas tenemos las siguientes:

- *JSTOR*
- *ScienceDirect*
- *SpringerLink*
- *Wiley Online Library*
- *SAGE Journals*
- *Google Books*
- *PubMed*
- *ArXiv*
- *ResearchGate*
- *Academia.edu*
- *SSRN (Social Science Research Network)*

## **2.2 Identificación de Variables**

### *2.2.1 Variable dependiente*

- Contenido de compuestos químicos no volátiles.
- Concentración de compuestos fenólicos, azúcares.
- Capacidad antioxidante y antimicrobiana.
- Relación de solventes orgánicos etanol-agua.

### *2.2.2 Variable independiente*

- Cacao clonado variable CCN-51
- Tiempo de liofilización
- Temperatura de liofilización
- Tamaño de partícula

## 2.3 Equipos, Materiales y Reactivos

2.3.1 *Materiales de laboratorio.* Los materiales de laboratorio empleados para los análisis experimentales adecuados e idóneos fueron previamente lavados y esterilizados para su utilización permitiendo mantener la eficiencia en los ensayos de laboratorio:

- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Balones volumétricos en diferentes medidas
- Vasos de precipitación en diferentes medidas
- Gradilla
- Matraz Erlenmeyer en diferentes medidas
- Frascos de reacción
- Viales de muestra
- Papel filtro
- Soporte universal
- Pinza metálica

2.3.2 *Equipos de laboratorio.* Los equipos de laboratorio indicados a continuación fueron previamente revisados y calibrados para su posterior uso:

- Estufa eléctrica marca MEMMERT modelo VN6400
- Espectrofotómetro UVmini-1240 marca SHIMADZU
- Micropipetas de 0-100uL, 0-1000ul y 1-10cc marca HACH
- Cromatógrafo UltiMate 3000 HPLC marca THERMO SCIENTIST
- Equipo de agitación de 8 ejes con motor eléctrico marca WEG
- Balanza analítica Marca THERMO SCIENTIST, modelo PX224
- Balanza analítica 500gr Marca BOECO
- Autoclave tipo olla marca ALL AMERICAN 50X
- Centrífuga de laboratorio marca BOECO modelo MC-24
- Liofilizador de vacío para laboratorio marca BIOBASE Freeze Dryer de 4 bandejas.
- Extractor automático de aceites y grasas para semillas marca YUEWO
- Agitador magnético con plancha de calentamiento marca THERMO SCIENTIST

2.3.3 *Reactivos.* Los reactivos de laboratorio indicados a continuación fueron previamente revisados a su fecha de expiración:

- Etanol con una pureza del 96%
- Agua destilada
- Reactivo de Folin Ciocalteu
- Acido 3-5 Dinitro-Salicílico
- Carbonato de sodio anhidro
- Acido gálico
- *Sacharomyces Cereviciae*
- *Echerichia Coli*
- Láminas Petrifilm marca 3M para recuento de colonias en mohos y levaduras
- Láminas Petrifilm marca 3M para recuento de colonias en anaerobios mesófilos
- Láminas Petrifilm marca 3M para recuento de colonias en *E. Coli* o coliformes totales

## 2.4 Diseño Metodológico y Procedimiento

2.4.1 *Tratamiento.* El cacao recolectado fue trasladado a las instalaciones de los Laboratorios de Investigación de la Universidad Técnica de Machala, se clasificó las almendras de cacao de las cascarillas, mucilago y placenta; siendo estos residuos orgánicos; luego de la separación, las almendras de cacao frescas fueron tratadas inmediatamente en un extractor automático de aceites y grasas para semillas marca YUEWO, para evitar oxidación pudiendo ser perjudicial a los análisis de realizar en dichas muestras.

Posteriormente al tratamiento indicado, se tomaron 4 muestras frescas de cacao en cantidades de 50 gramos cada una, para ser vertidas en vasos de precipitación y ser homogenizadas en un equipo de agitación de 8 ejes con motor eléctrico marca WEG con la ayuda de etanol y agua en un volumen de 250ml preparados en diferentes relaciones para cada muestra por un tiempo de 30 minutos, y posteriormente, ser filtradas las muestras disueltas.

**Tabla 7.** Identificación de muestras

<b>Muestras de Cacao</b>	<b>Disolución</b>
<b>M1</b>	Agua estéril 100%
<b>M2</b>	Etanol-agua 70:30
<b>M3</b>	Etanol-agua 50:50
<b>M4</b>	Etanol 100%

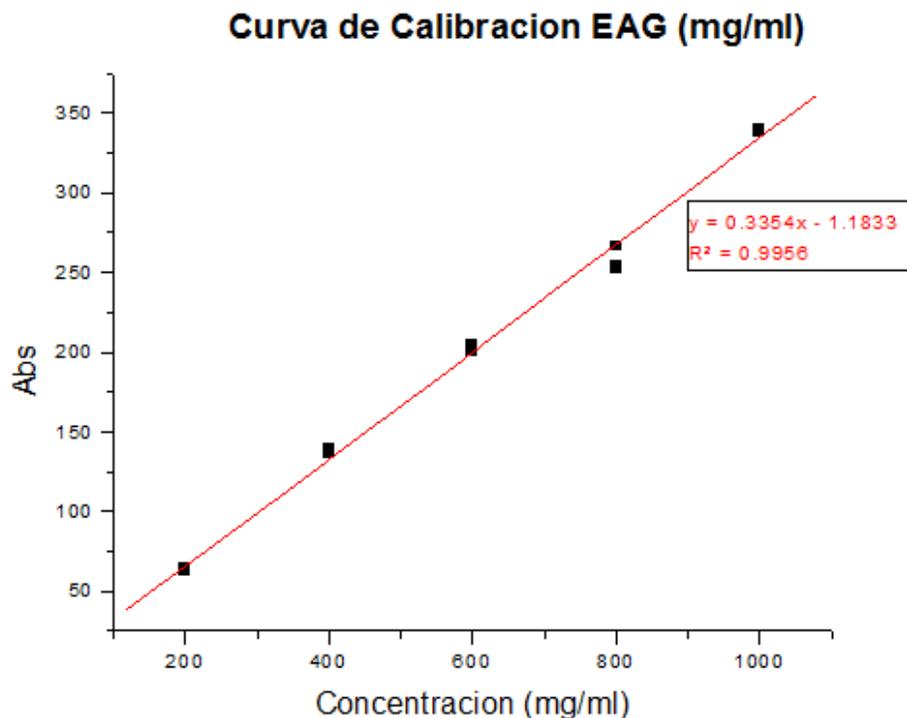
**Fuente:** Autor

*2.4.2 Extracción de compuestos fenólicos por liofilización.* Las disoluciones filtradas obtenidas fueron puestas en bandejas de tamaño 200\*20mm para ser tratados en un liofilizador marca Biobase de dimensiones de 720\*705\*730 mm, Freeze Dryer, 0,12M2 de 4 bandejas, en un tiempo de 72 horas, iniciándose en una fase de ultracongelación con temperatura de trampa fría de -60°C y una temperatura de muestra entre -25°C y -40°C en un lapso de 3 a 6 horas.

Posterior a la ultracongelación, se realizó el sublimado primario y secundario de las muestras teniendo el equipo una capacidad máxima de captura de agua de 3kg/24h con la ayuda de una bomba de presión al vacío, siendo controlados en un vacuómetro entre 60 a 70 horas, y finalmente ser retiradas y almacenadas.

*2.4.3 Cuantificación de Fenoles Totales por el método de Folin Ciocalteu.* Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales se basó en la metodología propuesta por Singleton en 1965. La curva de calibración se elaboró mediante disoluciones patrones de ácido gálico en concentraciones de 100, 200, 400, 600 y 800 mg/L; se añade 30uL en tubos de ensayo tipo rosca, con 30uL reactivo de FC, 750uL de NaCO<sub>3</sub> 0.1 N y 3cc de agua estéril por un tiempo de 30 minutos en un lugar sin acceso a la luz observándose un color azul oscuro determinando la presencia de fenoles.<sup>40</sup>

**Figura 15.** Curva de Calibración EAG



**Fuente:** Autor.

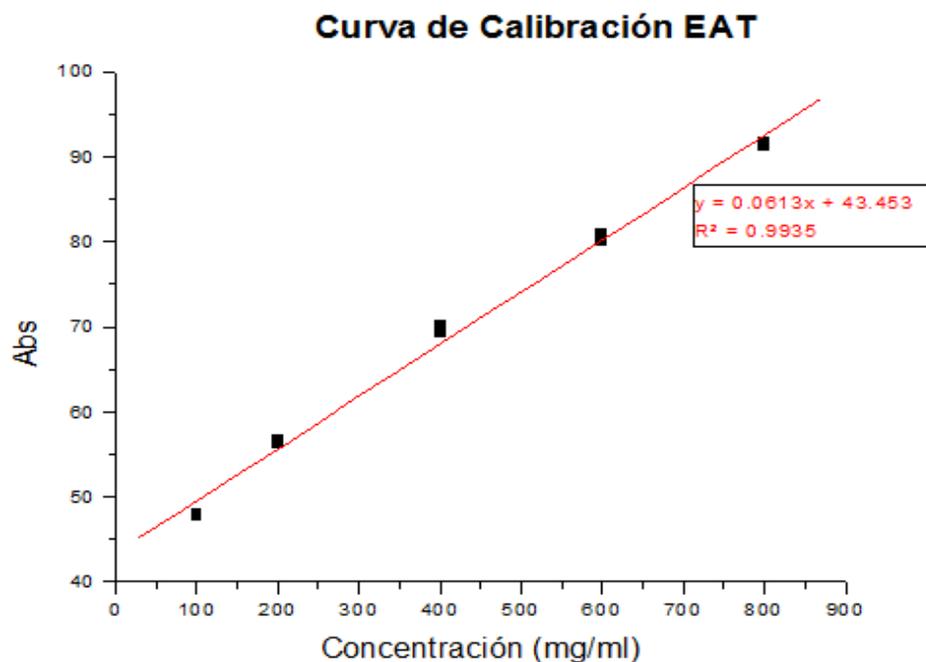
Para cuantificar los compuestos fenólicos totales se realizó experimentos por triplicado; se mezcló 2 gr de cada muestra liofilizada con 10ml de agua estéril vertidos en tubos de ensayo agitándose por 20 minutos, después se vertieron en viales las muestras y ubicadas en una centrifuga a 5000rpm por 7 minutos; transcurrido ese tiempo el sobrenadante obtenido fue extraído y puesto en tubos de ensayo para luego tomar 30uL de cada muestra y 30uL de reactivo de Folin Ciocalteu, homogenizándose por 8 minutos.<sup>40</sup>

Se añadió 750uL de NaCO<sub>3</sub> 0.1N y 3cc de agua estéril; medidas tomadas con la ayuda de una micropipeta; después se guardó por un tiempo de 2 horas en un lugar sin acceso a la luz, y luego se ubican las muestras en celdas de vidrio para ser analizadas en el espectrofotómetro midiendo la absorbancia.<sup>40</sup>

2.4.4 *Cuantificación de Azúcares reductores por el método de DNS.* Se prepararon disoluciones patrones de glucosa de 100, 200, 400, 600 y 800 mg/L. Se añadieron 250uL de cada solución y 250uL del reactivo DNS (ácido 3-5 Dinitro-salicílico) en tubos de ensayo recubiertos de papel aluminio; puestos en Baño María a 80 grados Celsius durante 7 minutos. Se paraliza la reacción para dejar que las muestras estén a temperatura de ambiente por 8 minutos, se añadió 2,5 ml de solución estéril, y se vierte en las celdas para realizar la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm.<sup>41,42</sup>

Para determinar el contenido de azúcares reductores, se tomó 2 gr de cada muestra disueltas en 10 ml de agua esterilizada, puestas en tubos de ensayo agitándose por 20 minutos, luego se vertió en viales para ser llevadas a una centrifuga a 5000rpm por 7 minutos; el sobrenadante obtenido de cada muestra, se extrajo 250uL ubicadas en tubos de ensayo, se agregó 250uL de DNS para homogenizar 8 minutos, seguido en baño termostático a 80°C por 5 minutos y agregando 2.5cc de agua estéril hasta disminuir a temperatura ambiente, vertimos las muestras en celdas y ser analizadas en el espectrofotómetro a 540nm.<sup>41,42</sup>

**Figura 16. Curva de Calibración glucosa**



**Fuente:** Autor

*2.4.5 Determinación de Componentes Fenólicos por CLAE-MS.* Se disolvieron las muestras en metanol (10 mg/mL) y se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,2 µm. El análisis mediante CLAE-EM se realizó en un sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San José, CA, USA) equipado con un detector de arreglo de diodos y acoplado a un detector de masas. La separación se desarrolló usando una columna Accucore RP-MS (100 mm x 2,1 mm; 2,6 µm) protegida por su cartucho (4 mm x 2,0 d.i.) y la temperatura de mantuvo a 35 °C.

La fase móvil estuvo constituida de acetonitrilo (A) y 0,1 % de ácido fórmico (B), y se empleó el siguiente gradiente: Entre 0 a 5 minutos (98% B), 5 a 10 minutos (98-80% B), 10 a 15 minutos (80-50 % B), 15 a 21 minutos (50-5 % B), y 21 a 23 minutos (5%B) y posterior recuperación de las condiciones iniciales. El volumen de inyección fue 2µL y la velocidad de flujo de 0.4mL/min. Para la detección UV se realizó simultáneamente a 210, 250, 280 y 330 nm, y los espectros UV-Visible se registraron en el rango 200-600 nm.

Como sistema de detección de masas se empleó un espectrómetro de masas de trampa lineal de iones equipado con una fuente de ionización de electronebulización, que fue operada en modo ion negativo. Los espectros de masas fueron adquiridos en el rango m/z 100-1000. Para los espectros MS2 se empleó la disociación por colisión inducida a una energía de 35 (unidades arbitrarias). Se empleó nitrógeno como gas principal, auxiliar y de barrido.

*2.4.6 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH.* La determinación de DPPH siguió la metodología propuesta por Brand-Williams con algunas modificaciones.<sup>43</sup> La curva de calibración se creó utilizando disoluciones etanólicas de trólox con concentraciones que oscilaban entre 0,027 y 0,277 mg/mL. 200 µL de las disoluciones preparadas se mezclaron con 3,8 µL de disolución etanólica de DPPH 0,1 mM.<sup>43,6</sup>

Para preparar la disolución control, se agregó 3,8 mL de DPPH (0,1 mM) con 200 µL de etanol absoluto por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente y ausencia de luz, este método permitió medir la capacidad secuestradora del radical libre permitiendo realizarse la lectura con espectrofotómetro a 517 nm en microceldas de plástico.<sup>43,44</sup> El porcentaje de inhibición de los valores obtenidos se calculó usando la ecuación:

$$\%DPPH = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} * 100 \quad (1)$$

Donde:

$A_{control}$ : Absorbancia del control.

$A_{muestra}$ : Absorbancia de la muestra luego de reaccionar con la solución de DPPH por 30 min

La capacidad antioxidante se midió en miligramos equivalentes a trolox por g de muestra extraída (mg TEAC/ g). Este procedimiento se llevó a cabo utilizando la ecuación de regresión lineal, donde se estableció la correlación entre el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH y la concentración de trolox.<sup>43,45</sup>

**2.4.7 Determinación de capacidad antimicrobiana.** Para el recuento de colonias y microorganismos se utilizaron láminas petrifilm marca 3M; las muestras polifenólicas fueron preparadas en solución estéril en concentraciones:

**Tabla 8. Preparación de muestras de cacao %p/v**

<b>Muestra de Cacao M1</b>	<b>Disolución (100ml)</b>
<b>C1</b>	3%
<b>C2</b>	5%
<b>C3</b>	7%
<b>Fuente. Autor</b>	

**2.4.7.1 Evaluación en *E. coli* totales.** Se mezcla 1ml de muestra polifenólica con 1ml de leche cruda recubriendo láminas petrifilm ya preparadas con *E. coli*. El espaciador de plástico dentro de las láminas distribuye uniformemente el líquido, asegurando una distribución uniforme, se ubicó en una incubadora con temperatura controlada durante 60 horas a 35°C. Los coliformes parecen colonias rojas rodeadas de burbujas de gas después de la incubación. La industria alimentaria utiliza este enfoque porque es rápido y sencillo.<sup>46,47</sup>

2.4.7.2 *Evaluación de aerobios mesófilos.* Se agregó 1 ml de la muestra polifenólica junto con 1ml de *E. coli* al 0.1% en solución estéril y 1ml de leche cruda puesto en láminas petrifilm para aerobios mesófilos diluyendo la muestra hasta extender y dejar solidificar durante unos minutos para permanecer a 30-35°C durante 60 horas. Se logró apreciar puntos rojos o rosados muy característicos de las colonias de aerobios mesófilos. Este método es ampliamente reconocido por su capacidad para producir resultados exactos y precisos en un corto período de tiempo.<sup>47,48</sup>

2.4.7.3 *Evaluación de mohos y levaduras.* Se añadió 1 ml de muestra polifenólica mezclado con 1ml de *Sacharomyces Cereviciae* y 1ml de leche cruda es la cantidad. El líquido debe estar espaciado uniformemente en las láminas. Se mantuvo la incubadora a una temperatura de 20-25 °C entre 60-72 horas. Los mohos crecen en colonias de diferentes colores y estructuras filamentosas, las colonias de levadura suelen ser puntos azules o verdes. Mediante esta técnica se detectan hongos en productos con alta humedad.<sup>47,49</sup>

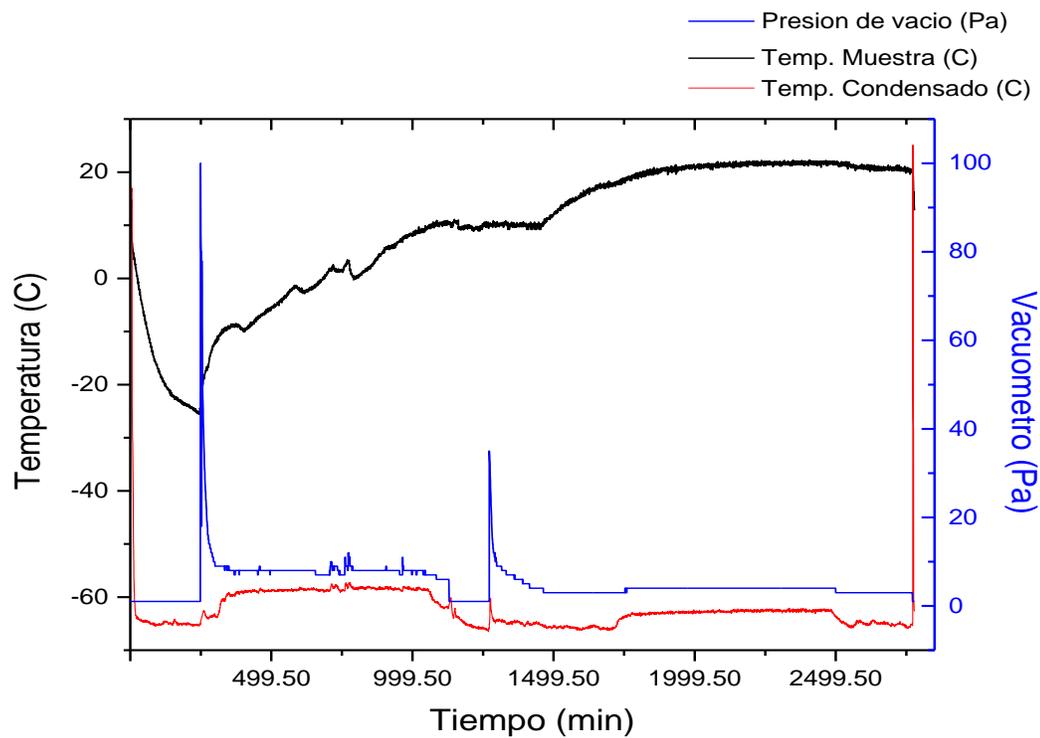
## CAPITULO 3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Extracción de compuestos fenólicos en las almendras de cacao

El tiempo para realizar la liofilización de las muestras de cacao diluidas fueron controladas tanto las temperaturas de la muestra como del sublimado, siendo determinante la presión al vacío para el secado por congelación. En las figuras siguientes se puede ver el control de temperatura, condensado y la presión de vacío a la que fueron sometidas las muestras a secarse por congelación.

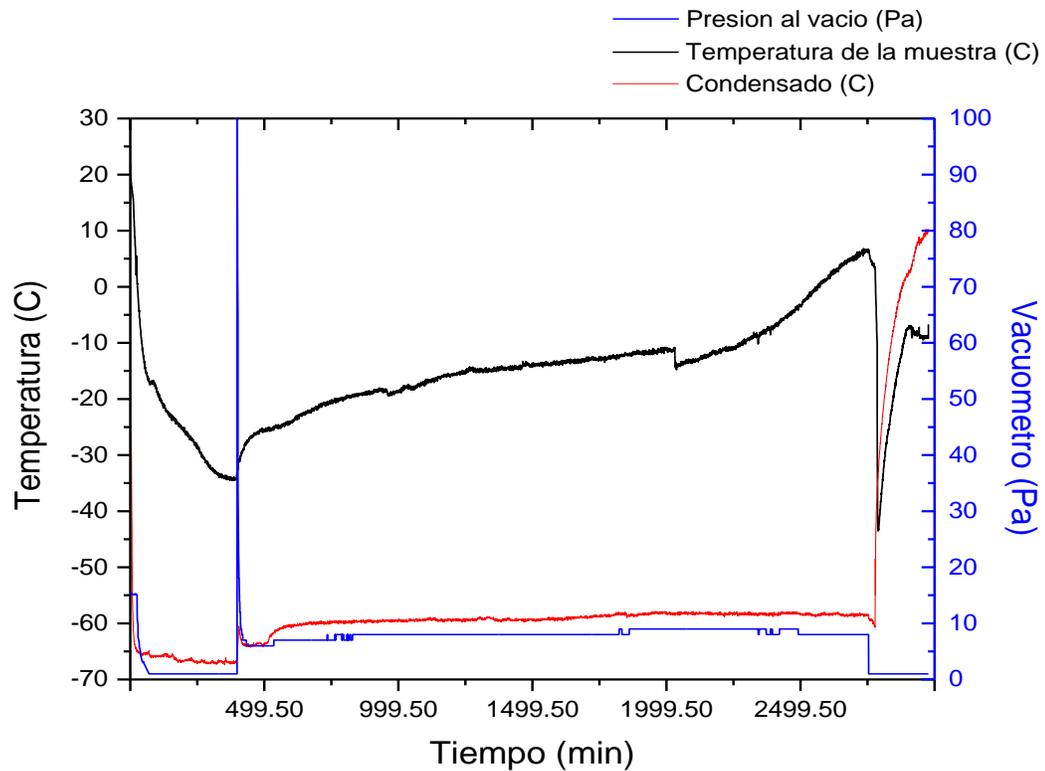
**Figura 17.** Liofilización del cacao en agua esteril



**Fuente:** Autor

En la figura 17 se aprecia que la fase de ultracongelación fue en un tiempo a 250min (4.17h), tiempo en la cual la temperatura de la muestra comienza a incrementar conforme se va secando el extracto fenólico a una P=100Pa debido a la disolución de la muestra preparada en agua estéril.

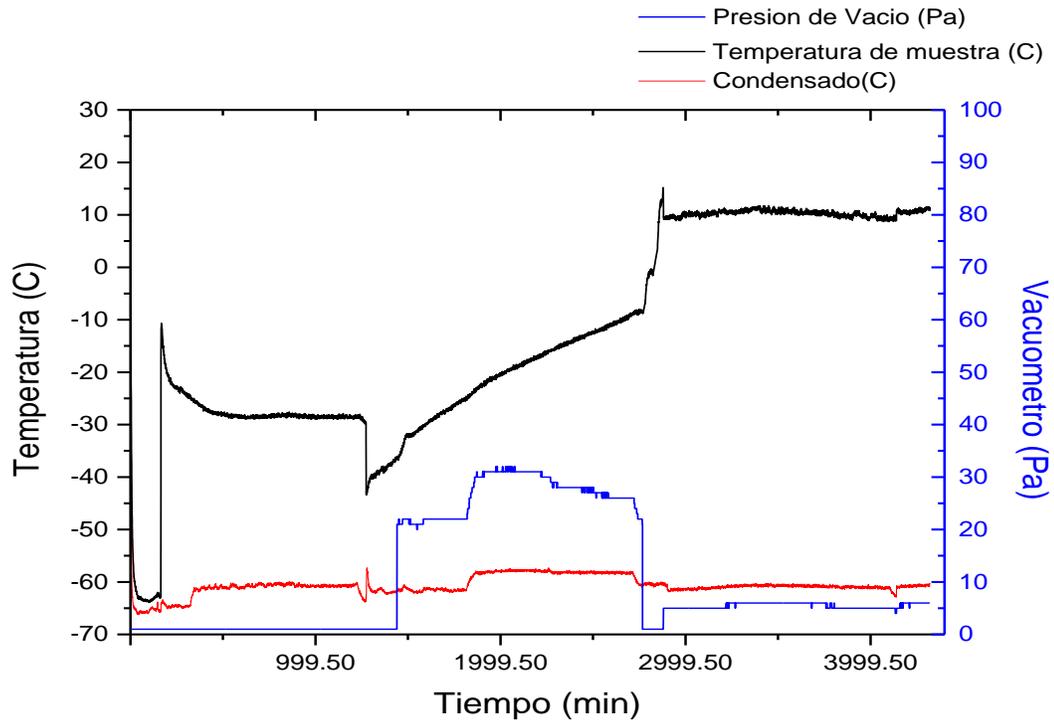
**Figura 18.** Liofilización del cacao en relación etanol-agua 50:50



**Fuente:** Autor

En la figura 18, se puede observar que el tiempo de ultracongelación fue mayor en relación a la figura 17 pero a la misma presión de vacío; a esto, el sublimado primario de donde se logró apreciar, es mayor el tiempo de secado en el sublimado primario que el secundario.

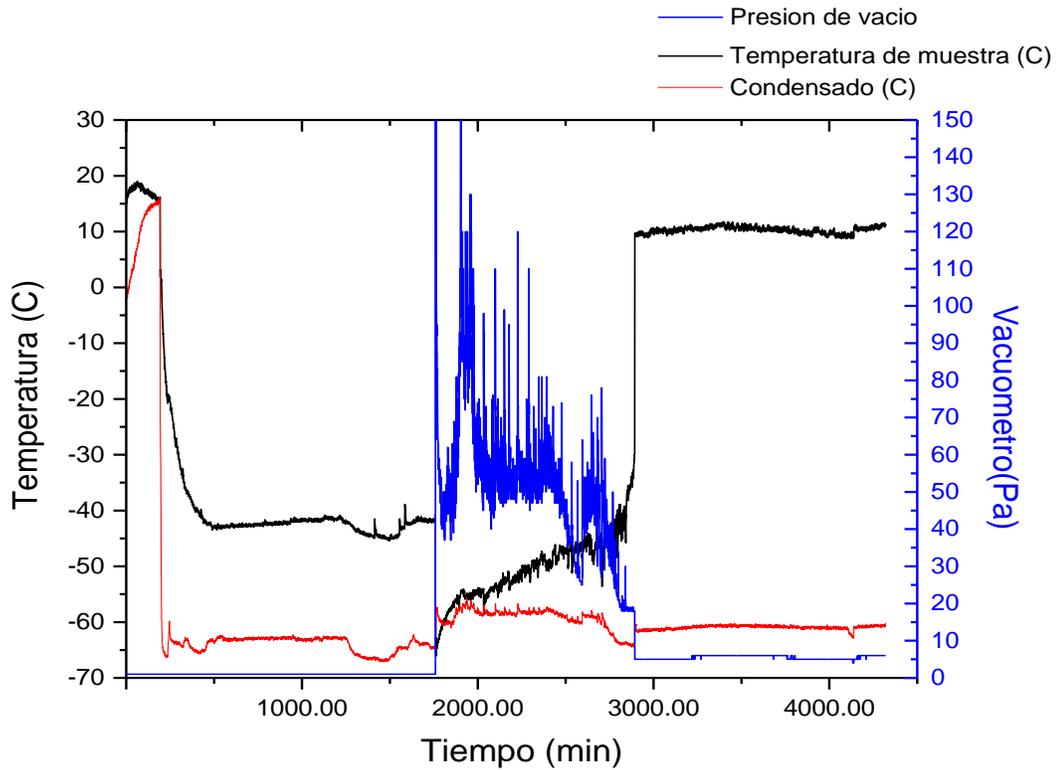
**Figura 19.** Liofilización del cacao en relación etanol-agua 70:30



**Fuente:** Autor.

En la figura 19, se aprecia que para el tiempo de ultracongelación fue alrededor de 1440 min (24 horas), siendo mayor a las figuras 17 y 18, pero su presión de vacío disminuyó de 100Pa a valores entre 20-30Pa, con un sublimado primario habiendo un incremento de temperatura; y en el sublimado secundario, se mantuvo su temperatura entre 10 y 12 grados celsius, teniendo una caída de presión hasta 1Pa.

**Figura 20.** Liofilización del cacao en relación etanol puro



**Fuente:** Autor

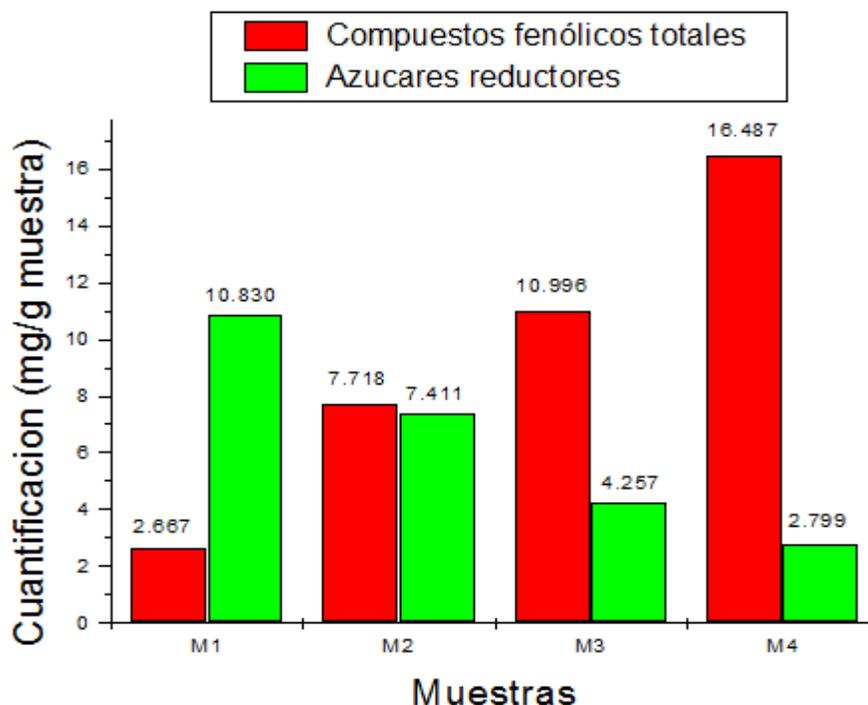
En la figura 20, se aprecia que para el tiempo de ultracongelación fue alrededor de 1750 min (29 horas), a partir de ese momento, el sublimado primario sufrió un incremento de temperatura muy inestable, notándose incluso un cambio brusco en la presión de vacío en esta fase; ya en el sublimado secundario, la presión decreció considerablemente hasta mantenerse constante en la mayor parte del tiempo, incluyendo a la temperatura de la muestra cuando comenzó a efectuarse la segunda etapa del sublimado.

Los resultados de las muestras tratadas por liofilización fueron óptimos para extraer un concentrado de compuestos fenólicos, teniendo en cuenta que la relación de solventes orgánicos influye en la ultracongelación y sublimación, obteniéndose un extracto concentrado en forma de polvo.

### 3.2 Correlación del contenido de compuestos fenólicos totales y azúcares reductores.

Luego de haber obtenido el modelo matemático por la curva de calibración, el valor medido por análisis espectrofotométrico será la absorbancia siendo reemplazado en el modelo matemático y despejando la variable, encontramos cantidad de compuestos fenólicos totales y azúcares reductores. En la figura 20 se puede apreciar el contenido de compuestos fenólicos totales y azúcares reductores en las almendras de cacao liofilizadas.

Figura 21. Contenido de C.F.T y A.R.



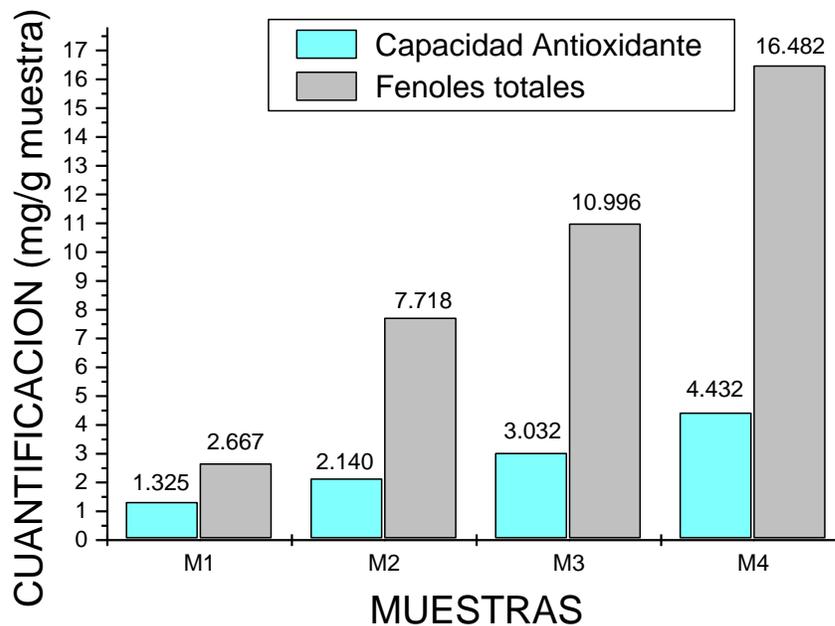
Fuente: Autor

Como se logra apreciar, en la muestra M1 los contenidos de C.F.T y A.R. difieren mucho a la muestra M4, ya que la muestra M1 es una solución de agua estéril pura, en cambio en la muestra M4 es una solución etanólica pura; dando a entender que en cuanto más puro sea el solvente orgánico se podrá obtener mejores resultados acorde a las relaciones de solventes que se quiera formular.

### 3.3 Correlación del contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

Luego de haber obtenido el modelo matemático por la curva de calibración, el valor medido por análisis espectrofotométrico será la absorbancia para los compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante; ambos reemplazados en sus respectivos modelos matemáticos y despejando la variable encontramos cantidad de compuestos fenólicos totales y su radical antioxidante en mg/g muestra. En la figura 21 se puede apreciar el contenido de compuestos fenólicos totales y su radical antioxidante en las almendras de cacao liofilizadas.

**Figura 22.** Correlación del contenido de C.F.T y actividad antioxidante.



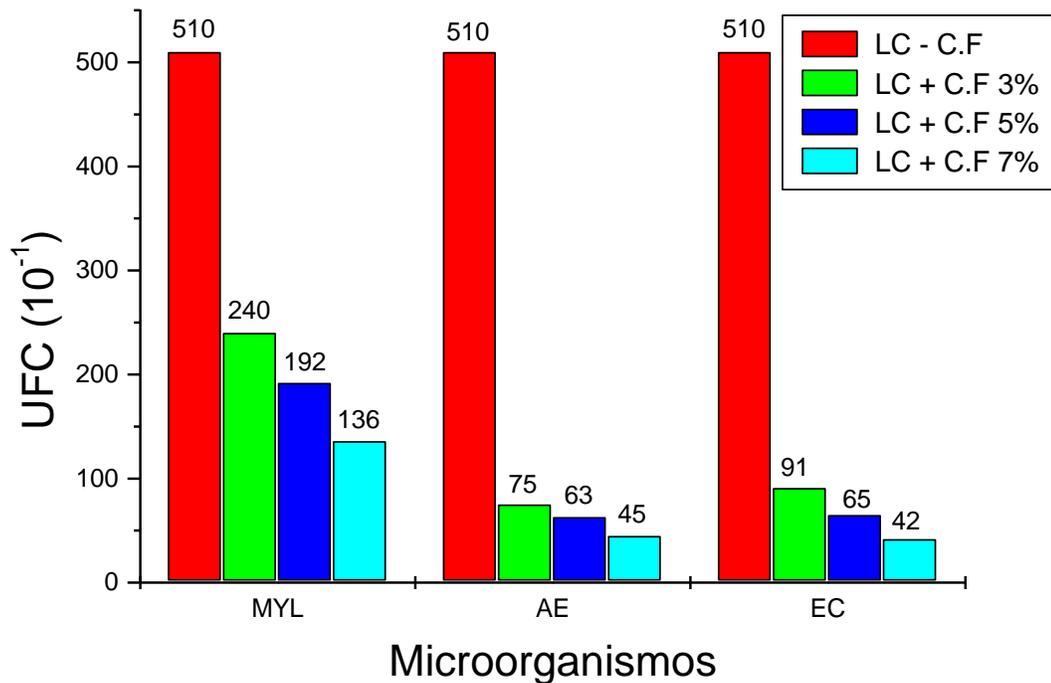
**Fuente:** Autor

En la figura 21 podemos visualizar que en cuanto mayor sea el contenido de fenoles totales mayor será la capacidad antioxidante de las almendras de cacao CCN-51, lográndose apreciar un cambio significativo entre las muestras M1 y M4.

### 3.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana en leche cruda

Los resultados obtenidos en los ensayos experimentales referente al análisis microbiológico de la leche pura aplicando un control en un indicador sin presencia de polifenoles dando valores con cifras significativas. En la figura 22 se puede visualizar los resultados, en las cuales podemos ver que los compuestos fenólicos tienen un efecto inhibitor en su crecimiento antimicrobiano y esto se debe a su alta capacidad antioxidante en los alimentos.

**Figura 23.** Actividad antimicrobiana: mohos y levaduras (MyL), aeróbios mesófilos (AE), *E. coli* (EC).

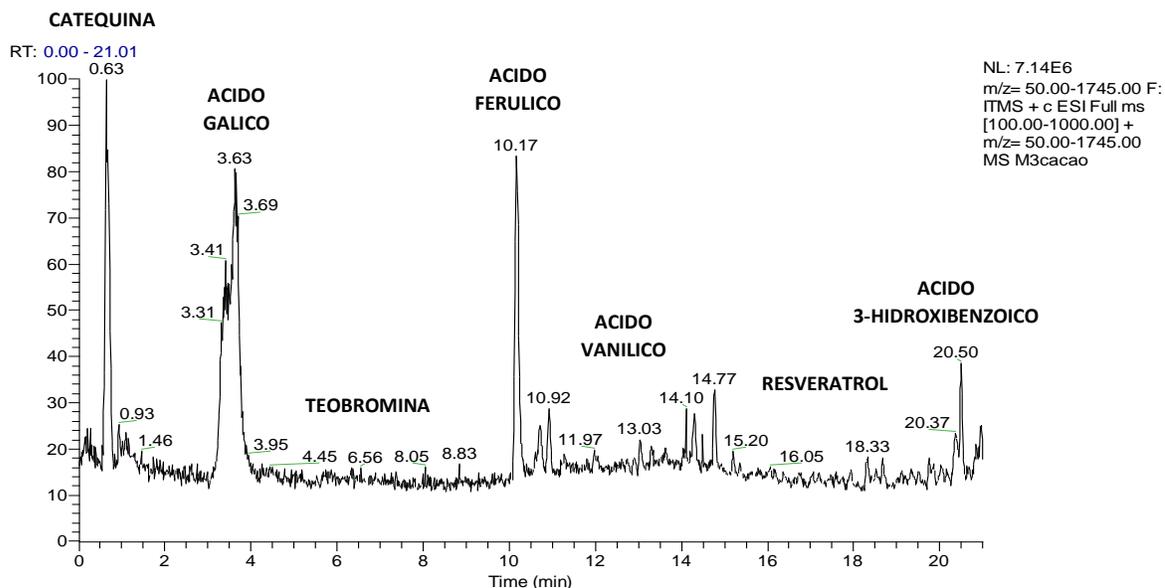


**Fuente:** Autor

### 3.5 Análisis cromatográficos de compuestos fenólicos

Los resultados obtenidos mediante CLAE-EM se visualizan en las figuras 23 y 24, valores dados en 2 muestras polifenólicas, una tratada con agua esteril y otra con etanol. En la figura 23 podemos observar que en los picos más altos no solamente se logró detectar componentes fenólicos, también se determinó presencia de flavonoides, estilbenos, entre otros; y según el tiempo de retención asociados a la figura 24 se obtiene las concentraciones en espectro m/z de varios componentes con su respectiva masa y formulación química.

**Figura 24.** CLAE-EM de los compuestos fenólicos

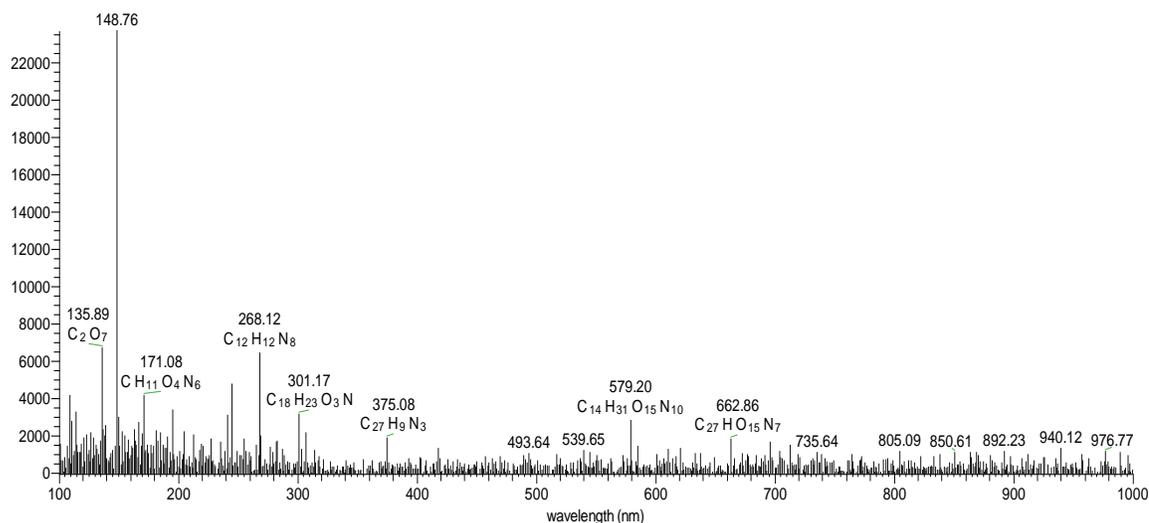


**Fuente:** Autor

En la figura se logró identificar ácidos fenólicos tales como Ácido Gálico, Vanílico, etc., pero también se identifican estilbenos como por ejemplo Resveratrol, alcaloides y flavonoides como Catequinas y Teobromina. Para un mejor detalle de la identificación de los componentes fenólicos, en la tabla 8 se detalla componentes fenólicos, alcaloides y flavonoides identificados con su respectiva concentración en ppm y tiempo de retención.

**Figura 25.** Espectro m/z a la concentración de componentes fenólicos

M3cacao #2721 RT: 12.33 AV: 1 NL: 2  
 F: ITMS + c ESI Full ms [100.00-1000.00]



**Fuente:** Autor

En la figura 25 se observa identificación de componentes a muy bajas concentraciones dificultando la búsqueda, a diferencia del anterior análisis, aquí se logra visualizar picos bajos en el cromatograma.

**Tabla 9.** Identificación de componentes fenólicos

Nombre Común	Formula Química	Comp. Orgánico	RTr (min)	RT (min)	m/z r	m/z	Delta (ppm)
Catequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Flavonoide	0.75	0.63 <sup>50</sup>	295.9	296.16 <sup>50</sup>	0.08
Epicatequina	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Flavonoide	3.58	3.63 <sup>51</sup>	270.27	268.17 <sup>51</sup>	2.26
Quercetina-3-O-glucósido	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	Flavonoide	3.50	3.63 <sup>52</sup>	418	415.08 <sup>52</sup>	0.39
Acido gálico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	A. Fenólico	3.63	3.63 <sup>53</sup>	169.12	165.14 <sup>53</sup>	13.03
Acido p-cumárico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	A. Fenólico	4.27	4.25 <sup>54</sup>	133.04	137.04 <sup>54</sup>	3.84

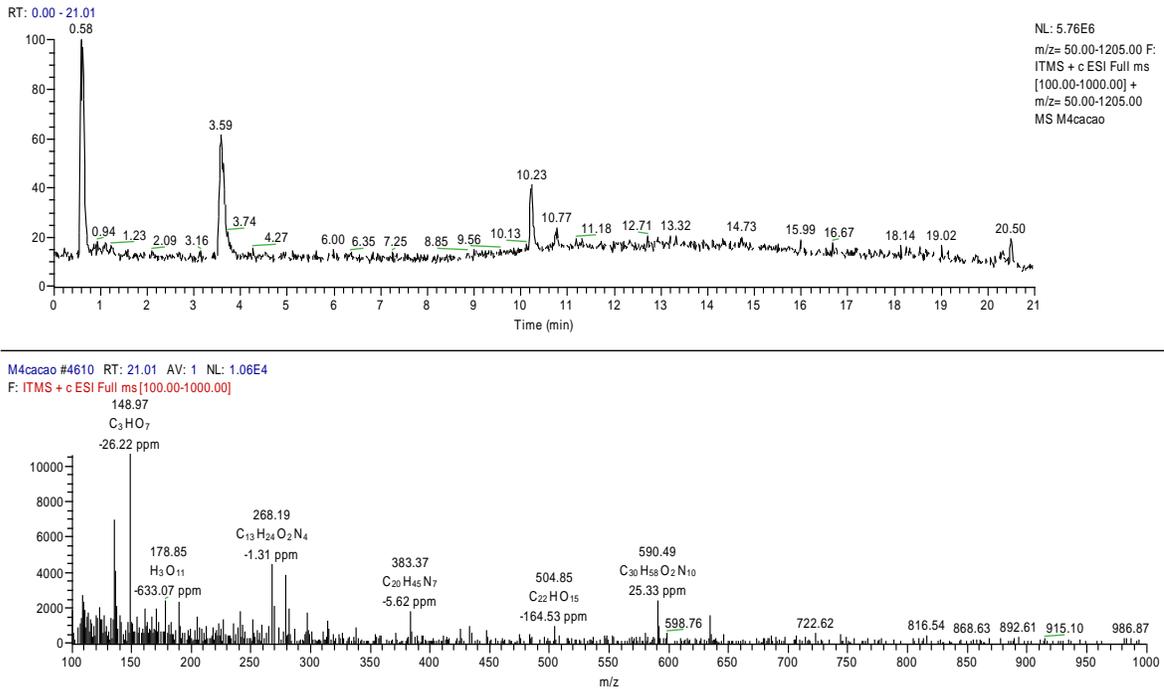
Nombre Común	Formula Química	Comp. Orgánico	RTr (min)	RT (min)	m/z r	m/z	Delta (ppm)
Ácido Ferúlico	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	A. Fenólico	10.01	10.17 <sup>55</sup>	193.05	197.01 <sup>55</sup>	1.82
Prodelphinidina B2	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	Tanino	11.25	11.26 <sup>56</sup>	595.14	596.18 <sup>56</sup>	1.13
Naringenina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Flavonoide	11.20	11.26 <sup>57</sup>	273.06	268.13 <sup>57</sup>	1.13
Ácido Clorogénico	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	A. Fenólico	11.24	11.26 <sup>58</sup>	191.05	193.04 <sup>58</sup>	4.28
Prodelphinidina C2	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	Tanino	11.95	11.97 <sup>59</sup>	459.05	460.08 <sup>59</sup>	0.50
Rutina	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	Flavonoide	11.90	11.97 <sup>60</sup>	480.12	482.22 <sup>60</sup>	0.05
Ácido Vanílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	A. Fenólico	14.30	14.33 <sup>61</sup>	173.03	171.02 <sup>61</sup>	11.34
Procianidina C1	C <sub>42</sub> H <sub>36</sub> O <sub>20</sub>	Tanino	14.40	14.35 <sup>62</sup>	698.30	696.04 <sup>62</sup>	6.76
Procianidina B2	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Tanino	15.25	15.20 <sup>63</sup>	558.18	557.13 <sup>63</sup>	0.55
Ácido Caféico	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	A. Fenólico	15.30	15.20 <sup>64</sup>	177.01	178.06 <sup>64</sup>	0.19
Resveratrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	Estilbenos	17.03	17.01 <sup>65</sup>	170.01	168.01 <sup>65</sup>	10.89
Eugenol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	Fenil propano.	17.11	17.20 <sup>66</sup>	164.21	162.99 <sup>66</sup>	9.15
Ácido Salicílico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	A. Fenólico	17.80	17.92 <sup>59</sup>	138.04	137.01 <sup>59</sup>	0.49
Luteolina	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	Flavonoide	17.99	17.92 <sup>67</sup>	256.10	255.08 <sup>67</sup>	1.19
Ácido elágico	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	A. Fenólico	18.45	18.32 <sup>68</sup>	302.24	300.30 <sup>68</sup>	5.37
Ácido 3-Hidroxibenzóico	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	A. Fenólico	20.10	20.02 <sup>69</sup>	137.05	136.99 <sup>69</sup>	19.85

**Fuente:** Autor.

**Figura 26.** CLAE-EM analizados de las almendras de cacao en una disolución esteril.

C:\Users\slower\Documents\hpl

16/05/24 09:01:09



**Fuente:** Autor

Finalmente, se obtuvo resultados de diversos componentes, entre estos la presencia de flavonoides que poseen un anillo fenil, que actúan con propiedades antimicrobianas; por ejemplo el ácido gálico actúa especialmente en bacterias gram-positivas (aerobios mesófilos) al igual que el ácido clorogénico que es muy eficaz inhibiendo el crecimiento microbiano; con la ayuda del eugenol que actúa en microorganismos de amplia gama, entre estos las bacterias y hongos, y principalmente de proantocianidinas que tienen altas propiedades significativas a nivel bacteriano, en especial de *Escherichia Coli*,

Todo es gracias a la alta capacidad antioxidante e inclusión de componente fenolicos que son importantes para la inhibición de microorganismos en alimentos permitiendo ser conservados.

## CAPITULO 4

### CONCLUSIONES

- Mediante extracción mecánica se obtuvo el sustrato acuoso de las almendras de cacao, para posterior al proceso de liofilización, concentrar el material soluble (polifenoles totales), el cual se cuantificó utilizando el método de Folin Ciocalteu, obteniendo valores en el mayor de los casos una cantidad de 16.487mg/g muestra.
- El análisis cromatográfico CLAE-EM de los extractos liofilizados de cacao nos indican que existen varios componentes con propiedad antimicrobiana como piperina de 157.22ppm, triptamina de 13.03ppm, nicotina de 11.34ppm, ácido benzoico de 19.85ppm, entre otros.
- Se evaluó la actividad antimicrobiana en leche cruda, observando que a menor concentración del 3% se favorece el crecimiento microbiano en un 10%, a diferencia de las concentraciones del 5% y 7%, donde se obtuvo un efecto inhibitor que disminuyó la actividad microbiana alrededor de un 25% y 50% en UFC.

## **CAPITULO 5**

### **RECOMENDACIONES**

- Calibrar los equipos a utilizar de forma correcta ya que permite tener valores más precisos.
- Etiquetar las muestras a analizar con los más mininos detalles: fecha, tiempo de análisis, temperatura, etc.
- Tener un protocolo claro y detallado para cada diseño experimental a efectuar.
- Elegir métodos y técnicas adecuadas o acordes al proyecto de investigación garantizando consistencia y validez en la obtención de resultados.
- Cumplir con todas las normas de seguridad implementadas en los laboratorios de investigación de la universidad siguiendo los protocolos de manipulación, manejo y almacenamiento de muestras, reactivos, materiales y equipos.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) DIRECCION GENERAL DE POLITICAS AGRARIAS. \_Commodities Cacao\_ Ene-Mar 2023. **2023**, 1–19.
- (2) Theobroma, I. N. Scientia Agropecuaria Control Cultural , Biológico y Químico de Moniliophthora Roreri y Phytophthora Spp En Theobroma Cacao ‘ CCN - 51 ’ Cultural , Biological and Chemical Control of Moniliophthora. **2019**, *10* (4), 511–520. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.08>.
- (3) Vargas Jentzsch, P.; Ciobotă, V.; Salinas, W.; Kampe, B.; Aponte, P. M.; Rösch, P.; Popp, J.; Ramos, L. A. Distinction of Ecuadorian Varieties of Fermented Cocoa Beans Using Raman Spectroscopy. *Food Chem.* **2016**, 211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.017>.
- (4) Silva Daquilema, A.; Pérez Quintana, M. L.; Bravo Sánchez, L. POLIFENOLES DE LA ALMENDRA DE THEOBROMA CACAO L. COMO ANTIOXIDANTE NATURAL EN CHORIZO FRESCO. *Cienc. Digit.* **2018**, *2* (2), 424–437. <https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v2i2.111>.
- (5) Alvarado-Ortiz Ureta Teresa Blanco Blasco Lima, C.; de, julio; Edición, S. *Alimentos Bromatología*; 2007.
- (6) Murcia Artunduaga, K. S.; Castañeda, M. del R. Evaluación Del Contenido de Fenoles Totales y Capacidad Antioxidante de Extractos Etanólicos de La Cáscara de Cacao (Theobroma Cacao L.). *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.* **2022**, *13* (2). <https://doi.org/10.22490/21456453.4717>.
- (7) Siedentopp, U. Cacao - Precious Protector for Heart and Blood Vessels. *Dtsch. Zeitschrift fur Akupunkt.* **2009**, *52* (3), 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.dza.2009.07.007>.
- (8) Propiedades Físicas y Químicas de Cultivares de Cacao (Theobroma Cacao L.) de

Ecuador y Perú. *Andrade-Almeida J1, Rivera-García J2, Chire-Fajardo GC2, Ureña-Peralta MO2* **2019**, 1–12.

(9) Aikpokpodion, P. O. Variation in Agro-Morphological Characteristics of Cacao, *Theobroma Cacao L.*, in Farmers' Fields in Nigeria. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* **2010**, 38 (2), 157–170. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2010.488786>.

(10) de MELO, C. W. B.; Bandeira, M. de J.; Maciel, L. F.; Bispo, E. da S.; de SOUZA, C. O.; Soares, S. E. Chemical Composition and Fatty Acids Profile of Chocolates Produced with Different Cocoa (*Theobroma Cacao L.*) Cultivars. *Food Sci. Technol.* **2020**, 40 (2), 326–333. <https://doi.org/10.1590/fst.43018>.

(11) Amorim Homem de Abreu Loureiro, G.; Reis de Araujo, Q.; René-Valle, R.; Andrade-Sodré, G.; Moreira de Souza, S. M. Influencia de Factores Agroambientales Sobre La Calidad Del Clon de Cacao (*Theobroma Cacao L.*) PH-16 En La Región Cacaotera de Bahia, Brasil. *Ecosistemas y Recur. Agropecu.* **2017**, 4 (12), 579. <https://doi.org/10.19136/era.a4n12.1274>.

(12) Fersenth, L.-V. J. C.-S. E. M.-Q. Estrategias Para El Cultivo, Comercialización Y Del Cacao Fino de Aroma En Ecuador. **2016**, 45–55.

(13) Aprovechando Cascarilla de Cacao. *Karla Alvarez, Fr. Abad* **2018**.

(14) Astrid Vargas Pérez, O.; Alexander Vite Cevallos, H.; Maribel Quezada Campoverde, J. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL IMPACTO ECONÓMICO DEL CULTIVO DEL CACAO EN ECUADOR DEL PRIMER SEMESTRE 2019 VERSUS EL PRIMER SEMESTRE 2020. **2021**.

(15) De, C.; Bioquímica, I. *UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS*.

(16) Química, C. *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD*

*DE CIENCIAS PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS ASOCIADOS A LA CALIDAD DE MATERIALES SELECCIONADOS DE CACAO ECUATORIANO; 2022.*

(17) De Ingeniería, C.; Alimentos, E. N.; Patricio, B.; Ullon, R. *UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS Autor.*

(18) Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Revisión Los Polifenoles, Compuestos de Origen Natural Con Efectos Saludables Sobre El Sistema Cardiovascular. *Nutr Hosp* **2012**, 27 (1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>.

(19) Nardini, M. Phenolic Compounds in Food: Characterization and Health Benefits. *Molecules*. MDPI February 1, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27030783>.

(20) *OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS ESPAÑA.*

(21) Lujano, E.; Manganiello, L.; Contento, A.; Ríos, Á. *Identificación y Cuantificación de (+) - Catequinas y Procianidinas En Cacao Procedente de Ocumare de La Costa, Venezuela / Identification and Quantification of (+) - Catechins and Procyanidins in Cocoa from Ocumare de La Costa, Venezuela*; 2019.

(22) Chacón Ortiz, C. Y.; Mori Culqui, P. L.; Chavez Quintana, S. G. Antioxidantes y Polifenoles Totales de Chocolate Negro Con Incorporación de Cacao (*Theobroma Cacao* L.) Crudo. *Rev. Investig. Altoandinas - J. High Andean Res.* **2021**, 23 (4). <https://doi.org/10.18271/ria.2021.331>.

(23) Khan, J.; Deb, P. K.; Priya, S.; Medina, K. D.; Devi, R.; Walode, S. G.; Rudrapal, M. Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns. *Molecules*. MDPI AG July 1, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26134021>.

(24) Maldonado-Astudillo, Y. I.; Gutiérrez González, A. A.; Flores Rogel, Y. L.; Arámbula Villa, G.; Flores Casamayor, V.; Jiménez-Hernández, J.; Ramírez, M.; Álvarez Fitz, P.;

Salazar López, R. Propiedades Morfométricas, Fisicoquímicas y Actividad Antiproliferativa de Maíces Pigmentados de Guerrero. *Nov. Sci.* **2021**, 13 (27). <https://doi.org/10.21640/ns.v13i27.2825>.

(25) Bu, J. A. *Los Flavonoides y Su Efecto Neuroprotector Frente a Enfermedades Neurodegenerativas*. <https://www.researchgate.net/publication/357764505>.

(26) Antioxidante, C.; Salvia, E. N.; Roja, S. *FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD*; 2019.

(27) S. Tello-Alonso 1, C. H. A.-A. M. S. V.-M. y M. del S. L.-C. Contenido de Compuestos Bioactivos En Theobroma Cacao L. (Seco y Fermentado) de La Región Del Soconusco, Chiapas. **2020**, 1–6.

(28) 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. Biotechnological Approaches for Cocoa Waste Management: A Review. *Waste Manag.* **2019**, 90, 72–83. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2019.04.030>.

(29) Rios-Aguirre, S.; Gil-Garzón, M. A. Microencapsulación Por Secado Por Aspersión de Compuestos Bioactivos En Diversas Matrices: Una Revisión. *Tecnológicas* **2021**, 24 (51), e1836. <https://doi.org/10.22430/22565337.1836>.

(30) Jusney Catherine, G. P.; Diaz B, L. F.; Elkyn, B. A.; Colombia, B.; *REVISIÓN: SOBRE LA APLICACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARÍA*; 2023.

(31) Páez, L.; López, N.; Salas, K.; Spaldillero, A.; Verde, O. Características Físico-Químicas de La Leche Cruda En Las Zonas de Aroa y Yaracal, Venezuela. *Rev. Cient. la Fac. Ciencias Vet. la Univ. del Zulia* **2002**, 12 (2), 113–120.

(32) Duchi Yaguachi, M.; Alberto Guerrero Luzuriaga, S. Caracterización Físico-Química De La Leche Cruda En Industrias Physical-Chemical Characterization of Raw Milk in Dairy

Industries and Storage Centers Located in the Province of Chimborazo-Ecuador. *Tierra Infin.* **2023**, 9, 175–184.

(33) Contero, R.; Requelme, N.; Cachipundo, C.; Acurio, D. Quality of Raw Milk and Payment System for Quality in Ecuador. *Granja* **2021**, 33 (1), 31–43. <https://doi.org/10.17163/LGR.N33.2021.03>.

(34) Suarez Ospina, D.; Morales Hernández, Y. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS BASIC PRINCIPLES OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION AND ANALYSIS OF MIXTURES. *América Rev. Semilleros Form. Investig.* **2018**, 4.

(35) Abril Díaz, N.; Antonio Bárcena Ruiz, J.; Fernández Reyes, E.; Galván Cejudo, A.; Jorrín Novo, J.; Peinado Peinado, J.; Toribio Meléndez-Valdés, F.; Túnez Fiñana, I. 8. *Espectrofometría: Espectros de Absorción y Cuantificación Colorimétrica de Biomoléculas*; 2019.

(36) Martínez, G.; López, F. *Determinación de Polifenoles Totales Por El Método de Folin-Ciocalteu Apellidos, Nombre*; 2019.

(37) Pedan, V.; Weber, C.; Do, T.; Fischer, N.; Reich, E.; Rohn, S. HPTLC Fingerprint Profile Analysis of Cocoa Proanthocyanidins Depending on Origin and Genotype. *Food Chem.* **2018**, 267, 277–287. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.08.109>.

(38) Sigüencia, J. A. Evaluacion de Un Secador Solar Inclinado Con Absorbedor de Zeolita Para Granos de Cacao Ccn51. **2013**, 187.

(39) Maleno Berenguer, F. J.; Martínez Navarrete, N.; Martínez Monzó, J. Evaluación Del Punto Final de La Liofilización En La Pulpa de Naranja. *Iiad* **2019**, 19.

(40) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16.

- (41) Burgos Montañez, L. J. Cuantificación de Azúcares Reductores Del Sustrato En Residuos de Piña Con El Método Del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. *Quest. Investig. Específica* **2020**, 7 (1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>.
- (42) Miller Lorenz, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, 31 (3), 426–428.
- (43) Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Microflowm E-b.* **1995**, 28, 25–30.
- (44) Fitri Faradilla, R.; Tamrin, T.; Nuh Ibrahim, M.; Rejeki, S.; Siala, A.; Firmansyah, F. Chemical, Mechanical, Antioxidant, and Antimicrobial Properties of Paper Prepared from Cocoa Bean Shell Using Polyethylene Glycol. *J. Food Nutr. Res.* **2019**, 7 (8), 579–583. <https://doi.org/10.12691/jfnr-7-8-5>.
- (45) Zapata Bustamante, S.; Tamayo Tenorio, A.; Benjamín Alberto Rojano, C. *Efecto de La Fermentación Sobre La Actividad Antioxidante de Diferentes Clones de Cacao Colombiano Effect of Fermentation on the Antioxidant Activity of Different Colombian Cocoa Clones*; 2013; Vol. 18. <http://scielo.sld.cu>.
- (46) Kumar, V.; Ahire, J. J.; Taneja, N. K. Advancing Microbial Food Safety and Hazard Analysis through Predictive Mathematical Modeling. *The Microbe* **2024**, 2 (February), 100049. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100049>.
- (47) Salgado, V. Análisis de Mesófilos Aerobios, Mohos y Levaduras, Coliformes Totales y Salmonellaspp. En Cuatro Ingredientes Utilizados En La Planta de Lácteos de Zamora. *Análisis mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes Total. y Salmonellaspp. en cuatro ingredientes Util. en la planta lácteos Zamora* **2016**, 9.
- (48) Mcallister, J. S.; Stadtherr, M. P.; Fox, T. L. Evaluation of the 3M Petrifilm™ Culture Plate Method for Enumerating Aerobic Flora and Coliforms in Poultry Processing Facilities. *J. Food Prot.* **1988**, 51 (8), 658–660. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-51.8.658>.

- (49) Schumacher, A.; Lingle, C.; Silbernagel, K. M. 3M™ Petrifilm Yeast and Mold Count Plate for the Enumeration of Yeasts and Molds in Dried Cannabis Flower: AOAC Official Method SM 997.02. *J. AOAC Int.* **2023**, *106* (2), 412–419. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac114>.
- (50) Lossada, E. Caracterización y Cuantificación Espectroscópica de Flavonoides y Catequinas Del Cacao Venezolano Para Ser Considerados En Formulaciones Cosméticas. *Rev. la Univ. del Zulia* **2021**, *12* (35). <https://doi.org/10.46925/rdluz.3512>.
- (51) Vargas-Arana, G.; Merino-Zegarra, C.; Tang, M.; Pertino, M. W.; Simirgiotis, M. J. UHPLC–MS Characterization, and Antioxidant and Nutritional Analysis of Cocoa Waste Flours from the Peruvian Amazon. *Antioxidants* **2022**, *11* (3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox11030595>.
- (52) Olga, J.; Casals, I.; Andr, C.; Izquierdo-pulido, M.; Lamuela-ravent, R. M. Liquid Chromatographic / Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Study of the Phenolic Composition of Cocoa ( Theobroma Cacao ). **2003**, 35–42. <https://doi.org/10.1002/jms.395>.
- (53) Jaimez, R. E.; Barragan, L.; Fernández-Niño, M.; Wessjohann, L. A.; Cedeño-Garcia, G.; Cantos, I. S.; Arteaga, F. Theobroma Cacao L. Cultivar CCN 51: A Comprehensive Review on Origin, Genetics, Sensory Properties, Production Dynamics, and Physiological Aspects. *PeerJ*. 2022. <https://doi.org/10.7717/peerj.12676>.
- (54) Escarpa, A.; Gonzalez, M. C. Critical Reviews in Analytical Chemistry An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. **2010**, No. April 2013, 37–41.
- (55) Adamson, G. E.; Lazarus, S. A.; Mitchell, A. E.; Prior, R. L.; Cao, G.; Jacobs, P. H.; Kremers, B. G.; Hammerstone, J. F.; Rucker, R. B.; Ritter, K. A.; Schmitz, H. H. HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. **1999**, No. 1994, 4184–4188.
- (56) Ali, F.; Ranneh, Y.; Ismail, A. Malaysian Cocoa Powder Using the HPLC-UV-ESI —

MS / MS and Probing Their Antioxidant Properties Identification of Phenolic Compounds in Polyphenols-Rich Extract of Malaysian Cocoa Powder Using the HPLC-UV-ESI — MS / MS and Probing Their Antioxidant Properties. **2013**, No. October 2014. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1187-4>.

(57) León-roque, N.; Margarita, B.; Guzmán, R.; Hidalgo-chávez, D. W. Identification of Flavonoids by HPLC-MS in Fruit Waste of Latin America : A Systematic Review. **2023**, *14* (1), 153–162.

(58) Luz, C.; Fern, Á.; Pimentel-moral, S. LC-MS and Spectrophotometric Approaches for Evaluation of Bioactive Compounds from Peru Cocoa By-Products for Commercial Applications. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25143177>.

(59) Li, L.; Aldini, G.; Carini, M.; Chen, C. O.; Chun, H.; Cho, S.; Park, K.; Renata, C.; Russell, R. M.; Blumberg, J. B.; Yeum, K. Characterisation , Extraction Efficiency , Stability and Antioxidant Activity of Phytonutrients in Angelica Keiskei. *Food Chem.* **2009**, *115* (1), 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.015>.

(60) Midori Natsume. Analyses of Poliphenols in Cacao Liquor, Cocoa and Chocolate by Normal-Phase an Reversed-Phase HPLC. <https://doi.org/https://doi.org/10.1271/bbb.64.2581>.

(61) Ordoñez, E. S.; Leon-Arevalo, A.; Rivera-Rojas, H.; Vargas, E. Quantification of Total Polyphenols and Antioxidant Capacity in Skins and Seeds from Cacao (*Theobroma Cacao* L.), Tuna (*Opuntia Ficus Indica* Mill), Grape (*Vitis Vinífera*) and Uvilla (*Pourouma Cecropiifolia*). *Sci. Agropecu.* **2019**, *10* (2), 175–183. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.02>.

(62) Nsor-atindana, J.; Zhong, F.; Mothibe, K. J. Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa ( *Theobroma Cacao* L .) Bean Shells Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa ( *Theobroma Cacao* L .) Bean Shells. **2012**, No. July. <https://doi.org/10.3923/pjn.2012.672.677>.

(63) Toro-Uribe, S.; Ibañez, E.; Decker, E. A.; Villamizar-Jaimes, A. R.; López-Giraldo, L.

J. Food-Safe Process for High Recovery of Flavonoids from Cocoa Beans: Antioxidant aND HPLC-DAD-ESIMS/ MS Analysis. *Antioxidants* **2020**, 9 (5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050364>.

(64) González, J.; Pérez, D.; Gómez, E.; Salgado, D. D. C.; Monan, M. UHPLC-DAD-ESI-MS / MS Analysis of Flavonoids from Ethanolic Extracts of Theobroma Cacao Husk in Cuba. **2019**, 6, 1–8. <https://doi.org/10.4236/oalib.1105439>.

(65) Baur, J. A.; Sinclair, D. A. Therapeutic Potential of Resveratrol: The in Vivo Evidence. **2006**, 5 (June). <https://doi.org/10.1038/nrd2060>.

(66) Mu, A.; Pagarra, H. Analysis of Phenolic Content and Antioxidant Activity of Cocoa Pod Husk ( Theobroma Cacao L .) Analysis of Phenolic Content and Antioxidant Activity of Cocoa Pod Husk ( Theobroma Cacao L .). **2019**. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012087>.

(67) Mar, C.; Andr, C.; Manuel, P.; Andr, C.; Plou, F. J.; Eduardo, P. Donors of Reducing Species : Relationship with Human Antioxidant Metabolism. **2023**.

(68) Cervantes, L.; Martínez-ferri, E.; Soria, C.; Ariza, M. T. Bioavailability of Phenolic Compounds in Strawberry, Raspberry and Blueberry: Insights for Breeding Programs. *Food Biosci.* **2020**, 100680. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100680>.

(69) Scalbert, A.; Williamson, G. Chocolate : Modern Science Investigates an Ancient Medicine Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols 1. *J. Nutr.* **2000**, 130 (8), 2073S-2085S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>.

## ANEXOS



**Anexo A.** Preparación de la muestra



**Anexo B.** Separación de las almendras de cacao de las cascarillas



**Anexo C.** Extracción de aceites grasos de las almendras



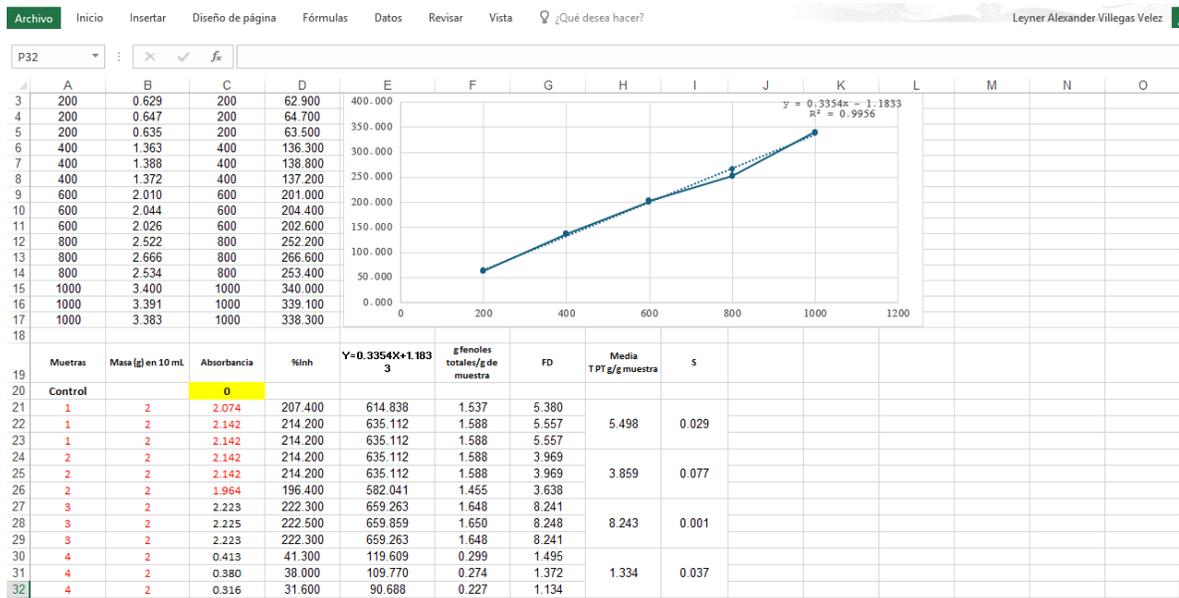
**Anexo D.** Preparación de las muestras para ultracongelación



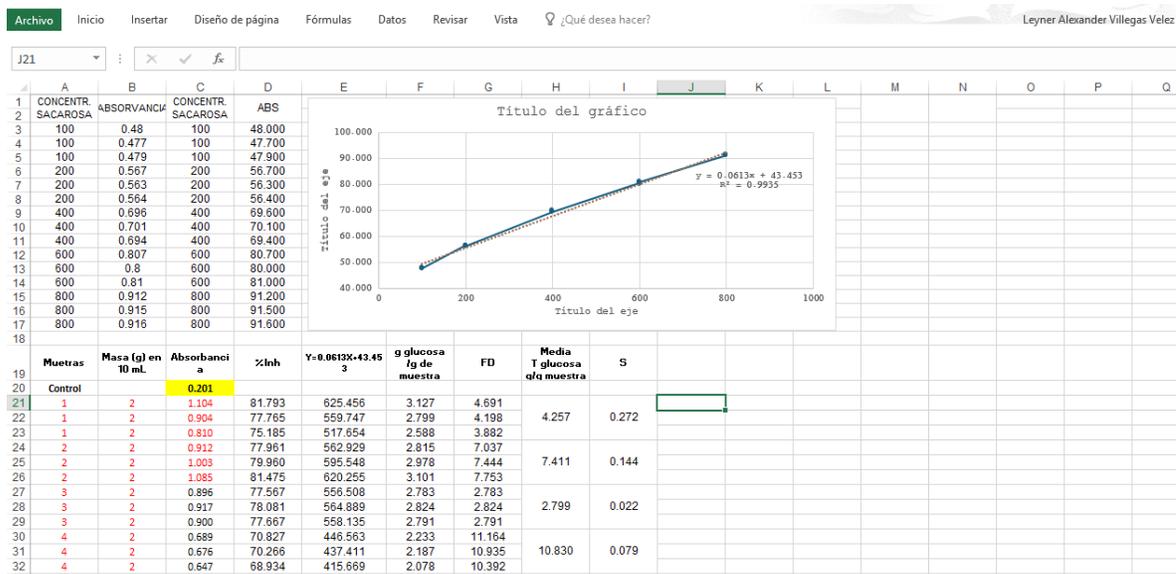
**Anexo E.** Liofilización de las muestras



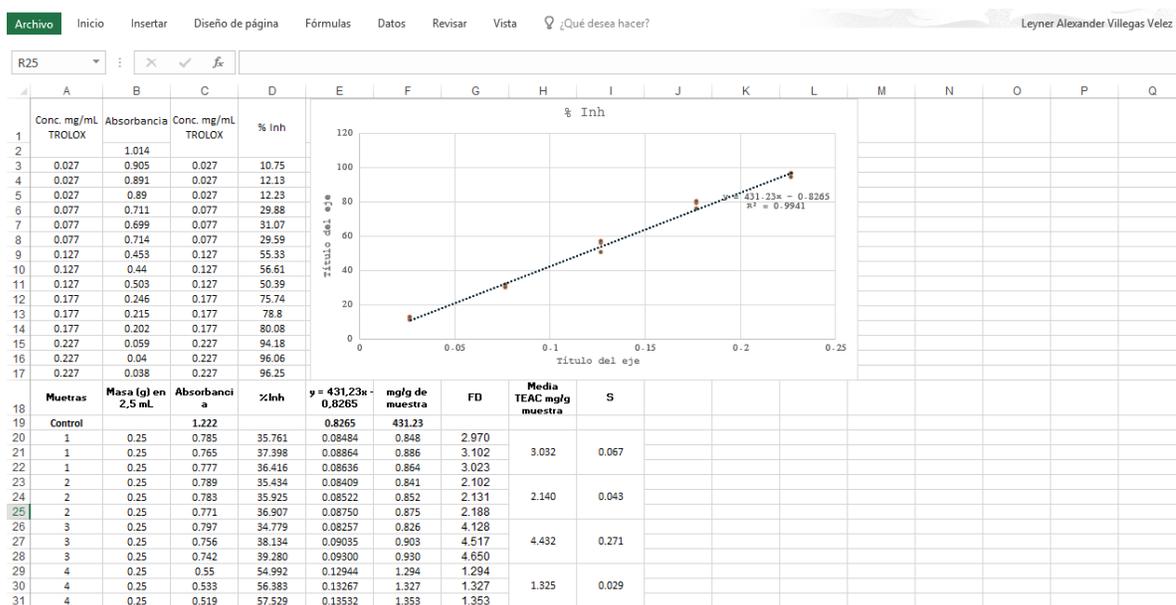
Anexo F. Cacao en polvo liofilizado



Anexo G. Cálculos preliminares en Excel para la cuantificación de polifenoles



Anexo H. Cálculos preliminares en Excel para la cuantificación de azúcares reductores



Anexo I. Cálculos preliminares para la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

Archivo Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista ¿Qué desea hacer? Leyner Alexander Villegas Velez

AI22

DATOS										DATOS										DATOS									
AGAR										AGAR										POLIFENOL									
8gr agar/100ml agua esteril										8gr agar/100ml agua esteril										M1= 3%, M2=5%, M3=7%, 0.5ml									
POLIFENOL										POLIFENOL										LECHE									
M1= 1%, M2=2%, M3=3%, 0.5ml										M1= 1%, M2=2%, M3=3%, 0.5ml										0.5ml									
LECHE										LECHE										SACHAR. CER.									
1ml										0.5ml										0ml									
SACHAR. CER.										SACHAR. CER.										E. COLI									
0ml										1gr S.C/1000ml agua esteril, 1ml										1m E.Coli/1000ml sol.0.1%									

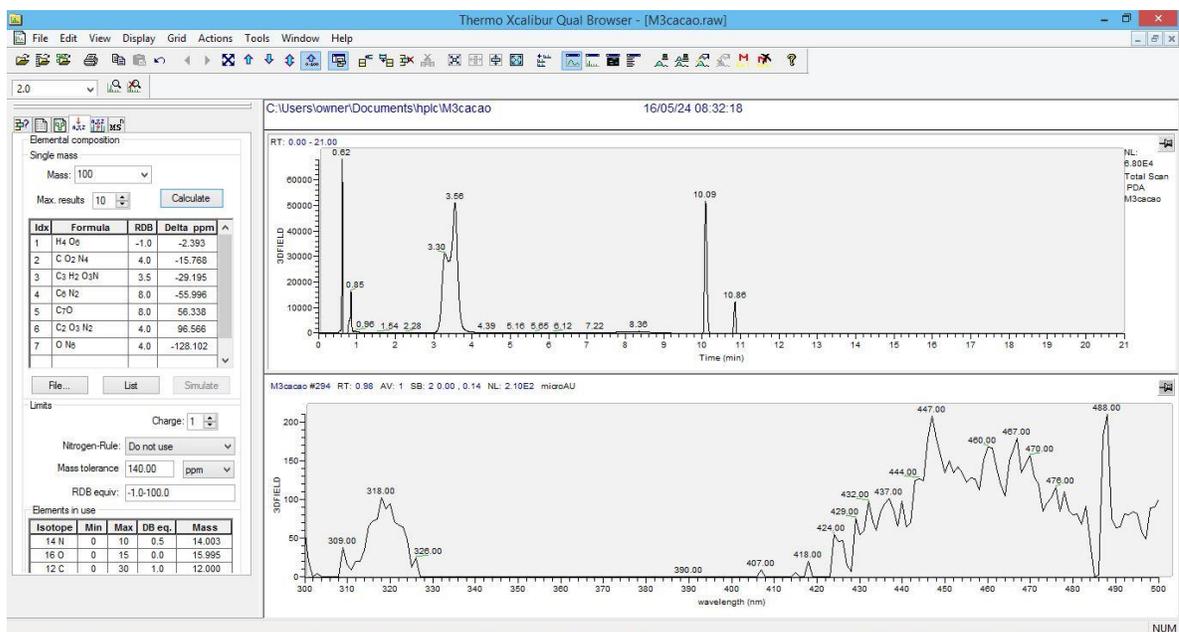
  

MUESTRA	T1	T2	T3	T1	T2	T3	MUESTRA	T1	T2	T3	T1	T2	T3	MUESTRA	T1	T2	T3
M1	17	10	14	10	7	12	M1	3	2	0	4	4	12	M1	240	192	136
	14	10	8	11	4	11		1	10	10	4	11	20		16	18	47
M2	19	10	10	22	22	28	M2	12	8	8	20	26	18	M2	75	63	45
	12	15	23	14	7	10		10	20	13	18	14	10		50	59	68
M3	31	23	44	18	19	14	M3	15	45	25	28	39	24	M3	91	65	42
	47	29	26	31	18	13		32	32	61	57	24	11		124	171	98
CONTROL	7	4	4	6	8	5	CONTROL	13	30	23	23	40	27	CONTROL	85		
	5	7	9	7	4	8		18	16	26	17	17	22		77	89	106

MUESTRA	T1	T2	T3	MUESTRA	T1	T2	T3
M1	76	54	65	M1	11	27	30
M2	70	87	56	M2	35	64	59
M3	110	184	76	M3	137	155	119
CONTROL	15	34	24	CONTROL	73	101	105

Anexo J.- Cálculos preliminares para la determinación de la capacidad antimicrobiana



Anexo K.- Cromatograma obtenido del análisis de las almendras

**Anexo L.- Identificación de componente orgánicos por CLAE-EM**

<b>Nombre Común</b>	<b>Comp. Orgánico</b>	<b>Composition</b>	<b>RT</b>	<b>m/z</b>	<b>Intensity</b>	<b>Relative</b>	<b>ppm</b>
<b>Ácido glicólico</b>	Ácido Orgánico	C <sub>3</sub> H O <sub>7</sub>	0.63	148.97	17826.7	26.76	1.75
<b>Nonadecano</b>	Alcano	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	0.63	268.31	11651.1	17.49	5.64
<b>Trifenilmetano</b>	<i>Hid Aromático</i>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub>	0.63	296.16	22966.1	34.47	0.08
<b>Insulina</b>	Proteína	C <sub>29</sub> H <sub>39</sub> O <sub>12</sub> N <sub>9</sub>	0.63	705.27	21507.9	32.28	4.55
<b>Biotina</b>	Vitamina	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> N <sub>6</sub>	0.63	381.15	48080.8	72.17	0.38
<b>Trifluoroacetaldehído</b>	Aldehído	C <sub>3</sub> H O <sub>13</sub>	0.93	244.94	24759.2	77.85	4.59
<b>Adenina</b>	Base Nitrogenada	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> N <sub>5</sub>	0.93	268.14	22015.2	69.23	0.44
<b>Doxiciclina</b>	Antibiótico	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	3.41	415.21	25290.7	3.10	0.43
<b>Purina</b>	Base Nitrogenada	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	3.41	183.05	12767.9	1.56	2.05
<b>Codeína</b>	Alcaloide	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O N	3.63	268.17	18253.0	1.43	2.26
<b>Triptamina</b>	Alcaloide	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub>	3.63	165.14	10168.7	0.80	13.03
<b>Galato de Propilo</b>	<i>Éster Fenólico</i>	C <sub>24</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>	3.63	415.08	44190.9	3.45	0.39
<b>Glutati3n</b>	Péptido	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> N <sub>5</sub>	3.63	203.07	12907.9	1.01	2.96
<b>Vitamina B12</b>	Vitamina	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> N <sub>6</sub>	3.63	416.11	11411.7	0.89	0.04
<b>Heptadecano</b>	Alcano	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub>	4.25	235.24	3607.5	6.75	10.28
<b>Benzocaina</b>	Éster	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	4.25	269.13	5345.7	10.00	4.40
<b>Fenilhidrazina</b>	<i>Fenoles</i>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	4.25	137.04	5742.1	10.74	3.84
<b>Catequina</b>	<i>Fenoles</i>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	10.17	197.01	14617.4	1.17	1.82

Nombre Común	Compuesto Orgánico	Composition	RT	m/z	Intensity	Relative	ppm
<b>Avenanthramida</b>	Alcaloide	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> N <sub>7</sub>	11.26	596.18	14624.1	27.87	1.13
<b>Caffeína</b>	Alcaloide	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub>	11.26	268.13	5843.7	11.14	1.13
<b>Morfina</b>	Alcaloide	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> O <sub>8</sub> N <sub>6</sub>	11.26	597.27	4241.5	8.08	0.89
<b>Acetaminofen</b>	Compuesto fenólico	C <sub>6</sub> H O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	11.26	180.99	4739.7	9.03	10.59
<b>Nitrofenol</b>	Compuesto fenólico	C <sub>12</sub> H <sub>5</sub> O N <sub>2</sub>	11.26	193.04	4075.1	7.77	4.28
<b>Steviosida</b>	Glucósido	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> O N	11.26	265.24	5340.5	10.18	0.25
<b>Ergometrina</b>	Alcaloide	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> O <sub>15</sub> N <sub>7</sub>	11.97	459.05	41307.2	100.00	0.61
<b>Quinina</b>	Alcaloide	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>15</sub> N <sub>5</sub>	11.97	460.08	9698.8	23.48	0.50
<b>Taxol</b>	Alcaloide	C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> N <sub>5</sub>	11.97	482.22	4348.2	10.53	0.05
<b>Cefalexina</b>	Antibiótico	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>	11.97	268.10	5715.9	13.84	0.68
<b>Nicotina</b>	Alcaloide	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	12.61	301.14	2329.3	7.61	1.81
<b>Adrenalina</b>	Amida	C <sub>6</sub> H O <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	12.61	163.00	5203.9	16.99	3.42
<b>Erythromycin</b>	Antibiótico	C <sub>25</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> N	13.04	435.04	8554.5	16.93	0.49
<b>Rifampicina</b>	Antibiótico	C <sub>23</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> N	13.04	412.05	50537.7	100.00	0.27
<b>Ácido fólico</b>	Compuesto fenólico	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> O <sub>9</sub>	13.04	307.01	39728.4	78.61	2.07
<b>Erythromycin A</b>	Antibiótico	C <sub>25</sub> H <sub>17</sub> O <sub>15</sub> N <sub>10</sub>	14.28	697.09	23013.4	26.54	0.76
<b>Gentamicina</b>	Antibiótico	C <sub>30</sub> H <sub>11</sub> O <sub>12</sub> N <sub>7</sub>	14.28	661.05	7625.4	8.79	5.26
<b>Penicilina</b>	Antibiótico	C <sub>26</sub> H <sub>4</sub> O <sub>15</sub> N <sub>10</sub>	14.28	695.99	86718.9	100.00	8.45
<b>Paclitaxel</b>	Anticancerígeno	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub> N <sub>10</sub>	14.28	702.31	4597.4	5.30	3.12
<b>Ranitidina</b>	Antihistamínico	C <sub>17</sub> H <sub>3</sub> O <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	14.28	331.00	17047.9	19.66	0.10
<b>Chloroquinina</b>	Antimalárico	C <sub>29</sub> H <sub>6</sub> O <sub>15</sub> N <sub>6</sub>	14.28	677.99	6102.8	7.04	0.21

Nombre Común	Compuesto Orgánico	Composition	RT	m/z	Intensity	Relative	ppm
<b>Coenzima Q10</b>	Antioxidante	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O <sub>15</sub>	14.28	660.39	7750.9	8.94	2.63
<b>Nicotina</b>	Alcaloide	C <sub>9</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	14.33	171.02	4495.9	6.54	11.34
<b>Mepivacaína</b>	Anestésico local	C <sub>29</sub> H <sub>7</sub> O <sub>14</sub> N <sub>7</sub>	14.33	677.01	4499.7	6.55	1.85
<b>Cyclophosphamide</b>	Anticancerígeno	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub> O <sub>7</sub> N <sub>10</sub>	14.33	660.60	8492.7	12.36	208.00
<b>Vincristina</b>	Anticancerígeno	C <sub>28</sub> H <sub>51</sub> O <sub>11</sub> N <sub>7</sub>	14.33	661.36	5732.7	8.34	0.14
<b>Rituximab</b>	Anticuerpo monoclonal	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub> N <sub>7</sub>	14.33	696.12	68737.6	100.00	6.73
<b>Testosterona</b>	Hormona esteroidea	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	14.33	379.29	4501.8	6.55	0.92
<b>Azathioprina</b>	Inmunosupresor	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	14.33	331.13	8225.0	11.97	0.82
<b>Ropinirol</b>	Agonis. Dopaminérgico	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> N <sub>4</sub>	14.35	245.08	3823.5	9.00	0.67
<b>Nadifloxacin</b>	Antibiótico	C <sub>11</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> N	14.35	268.18	5254.4	12.37	1.07
<b>Rapamicina</b>	Antibiótico	C <sub>2</sub> H O <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	14.35	148.98	20161.9	47.47	3.47
<b>Cimetidina</b>	Antihistamínico	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>12</sub> N	14.35	234.98	2974.1	7.00	1.54
<b>Ácido úrico</b>	Compuesto fenólico	C <sub>30</sub> H <sub>12</sub> O <sub>15</sub> N <sub>6</sub>	14.35	696.04	42469.1	100.00	6.76
<b>Rutin</b>	Flavonoide	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub> N <sub>10</sub>	14.35	698.30	5527.5	13.02	0.31
<b>Anandamida</b>	Neurotransmisor	C <sub>4</sub> H O <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	14.35	169.00	4462.6	10.51	1.48
<b>Daunorrubicina</b>	Anticancerígeno	C <sub>28</sub> H <sub>59</sub> O <sub>10</sub> N <sub>10</sub>	14.73	695.49	5802.4	10.74	75.60
<b>Doxorrubicina</b>	Anticancerígeno	C <sub>24</sub> H <sub>13</sub>	14.73	301.10	3169.5	5.87	0.06
<b>Etopósido</b>	Anticancerígeno	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> O <sub>15</sub> N <sub>4</sub>	14.73	679.12	9594.4	17.76	6.61
<b>Idarubicina</b>	Anticancerígeno	C <sub>29</sub> H <sub>59</sub> O <sub>9</sub> N <sub>9</sub>	14.73	677.48	3961.0	7.33	57.43
<b>Mitomicina C</b>	Anticancerígeno	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub> O <sub>9</sub> N <sub>9</sub>	14.73	678.47	11529.8	21.34	27.55
<b>Taxotere</b>	Anticancerígeno	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub> N <sub>10</sub>	14.73	696.17	54020.8	100.00	1.26

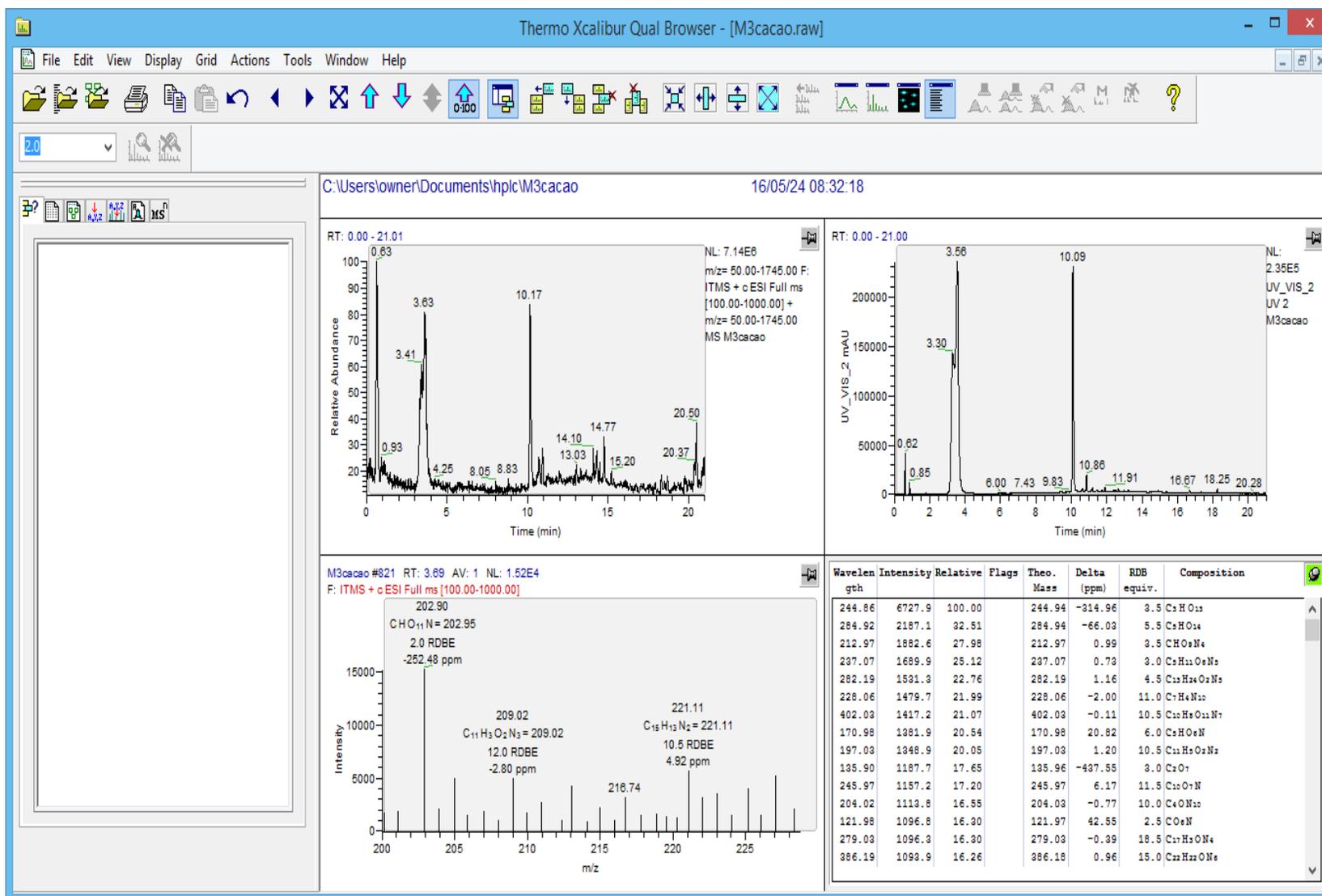
Nombre Común	Compuesto Orgánico	Composition	RT	m/z	Intensity	Relative	ppm
Rituximab	Anticuerpo monoclonal	C <sub>8</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> N <sub>6</sub>	14.73	268.19	5895.3	10.91	0.26
Hidroxicloroquina	Antimalárico	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> N <sub>5</sub>	14.73	215.10	7364.1	13.63	0.91
Acetilcolina	Neurotransmisor	C <sub>30</sub> H <sub>57</sub> O <sub>9</sub> N <sub>10</sub>	14.73	701.53	5879.7	10.88	139.34
Tetraciclina	Antibiótico	C <sub>30</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub> N <sub>4</sub>	14.81	678.11	9341.0	11.99	4.03
Doxorrubicina	Anticancerígeno	C <sub>30</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> N <sub>9</sub>	14.81	698.13	6999.7	8.99	3.97
Paclitaxel	Anticancerígeno	C <sub>29</sub> H <sub>29</sub> O <sub>13</sub> N <sub>8</sub>	14.81	697.19	26663.5	34.24	4.58
Vincristina	Anticancerígeno	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub> N <sub>7</sub>	14.81	696.12	77883.1	100.00	3.04
Difenhidramina	Antihistamínico	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>12</sub> N <sub>7</sub>	14.81	702.37	3919.6	5.03	5.61
Anisina	Compuesto fenólico	C <sub>9</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> N <sub>5</sub>	14.81	268.20	5973.7	7.67	0.14
Cyclosporina	Inmunosupresor	C <sub>30</sub> H <sub>4</sub> O <sub>13</sub> N <sub>10</sub>	14.81	712.00	6719.0	8.63	12.49
Dihydrocodeína	Alcaloide	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> N <sub>3</sub>	15.2	557.13	12198.7	27.09	0.55
Adrenalina	Amida	C <sub>30</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	15.2	556.10	45023.9	100.00	0.15
Ciprofloxacino	Antibiótico	C <sub>18</sub> H <sub>45</sub> O <sub>10</sub> N <sub>10</sub>	15.2	561.33	9917.1	22.03	0.47
Imipramina	Antidepresivo	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> O	15.2	171.08	5482.6	12.18	0.37
Retinol	Compuesto fenólico	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	15.2	216.06	4198.5	9.32	0.19
Estradiol	Esteroides	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub> N	15.2	558.12	3796.1	8.43	0.53
Estrona	Esteroides	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O <sub>14</sub> N	15.2	562.31	3088.0	6.86	0.24
Testosterona	Hormona esteroidea	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> N	15.2	360.27	3421.9	7.60	0.87
Retinoide	Vitamina A	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	15.2	241.05	4060.9	9.02	0.99
Naltrexona	Alcaloide	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> N	17.01	274.20	47890.8	100.00	1.15
Cefalexina	Antibiótico	C <sub>2</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> N <sub>7</sub>	17.01	217.11	2300.5	4.80	0.27

<b>Nombre Común</b>	<b>Compuesto Orgánico</b>	<b>Composition</b>	<b>RT</b>	<b>m/z</b>	<b>Intensity</b>	<b>Relative</b>	<b>ppm</b>
<b>Gentamicina</b>	Antibiótico	C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub> N <sub>8</sub>	17.01	313.09	4146.8	8.66	0.48
<b>Cafestol</b>	Compuesto fenólico	C <sub>3</sub> H O <sub>9</sub> N	17.01	194.97	2336.5	4.88	10.89
<b>Epinefrina</b>	Hormona esteroidea	C <sub>15</sub> H <sub>37</sub> O N <sub>3</sub>	17.01	275.29	10027.8	20.94	0.03
<b>Polidextrosa</b>	Polímero	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	17.01	268.09	5634.7	11.77	0.12
<b>Limoneno</b>	Terpeno	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub>	17.01	171.12	5545.7	11.58	3.35
<b>Morfina</b>	Alcaloide	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O N <sub>2</sub>	17.07	241.13	3958.3	12.03	3.69
<b>Piperina</b>	Alcaloide	C <sub>4</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub>	17.07	135.17	3379.2	10.27	157.22
<b>Cefaclor</b>	Antibiótico	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub>	17.07	229.04	2888.0	8.78	2.46
<b>Citalopram</b>	Antidepresivo	C <sub>15</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub>	17.07	274.32	32910.6	100.00	30.31
<b>Norepinefrina</b>	Hormona esteroidea	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> O N <sub>2</sub>	17.07	230.24	8712.8	26.47	6.34
<b>Cyclosporina</b>	Inmunosupresor	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> N <sub>7</sub>	17.07	269.23	3768.5	11.45	0.77
<b>Mirtazapina</b>	Antidepresivo	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	17.2	385.22	3818.1	7.94	0.55
<b>Nicardipina</b>	Antihipertensivo	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	17.2	224.06	2773.5	5.77	2.45
<b>Nimodipina</b>	Antihipertensivo	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	17.2	251.97	3449.7	7.18	2.46
<b>Loratadina</b>	Antihistamínico	C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	17.2	241.22	3485.1	7.25	13.71
<b>Indometacina</b>	Antiinflamatorio	C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> O <sub>3</sub> N	17.2	345.32	8654.6	18.01	1.55
<b>Ácido salicílico</b>	Compuesto fenólico	C <sub>7</sub> H O <sub>4</sub> N	17.2	162.99	3394.1	7.06	9.15
<b>Eugenol</b>	Compuesto fenólico	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O	17.2	274.23	4134.7	8.60	5.93
<b>Ácido caféico</b>	Compuesto fenólico	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> N	17.92	167.01	3076.6	6.53	0.49
<b>Quercetina</b>	Flavonoide	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	17.92	255.08	13697.9	29.07	1.19
<b>Testosterona</b>	Hormona esteroidea	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub> N	17.92	333.23	3991.7	8.47	2.05

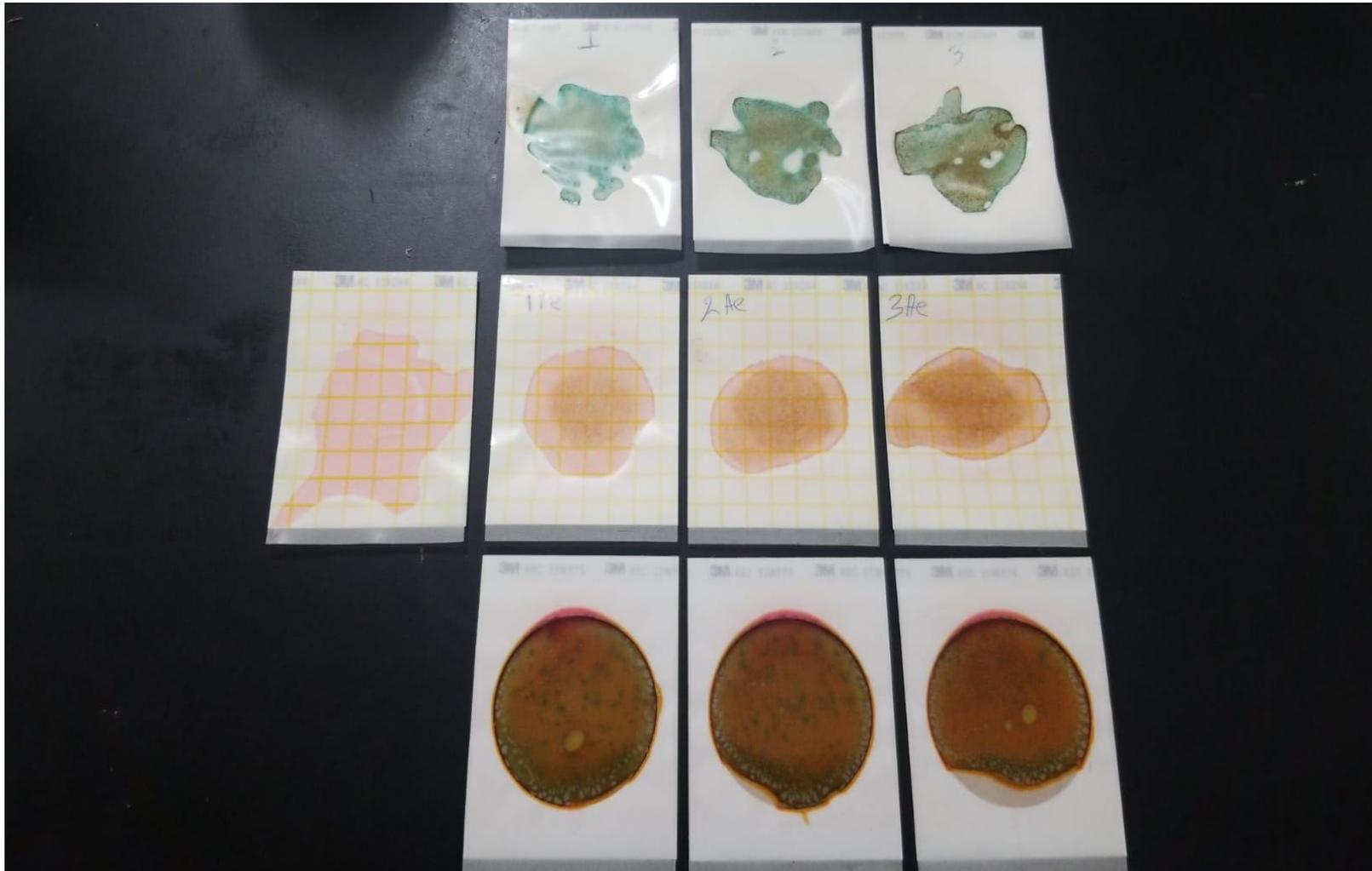
Nombre Común	Compuesto Orgánico	Composition	RT	m/z	Intensity	Relative	ppm
Dextrano	Polímero	C <sub>15</sub> H <sub>36</sub> O N <sub>6</sub>	17.92	316.29	11613.9	24.65	0.33
Ácido gálico	Compuesto fenólico	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> O <sub>12</sub>	18.28	266.96	3239.7	5.19	2.90
Colesterol	Esteroides	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> N	18.28	282.32	4478.8	7.17	15.87
Estrona	Esteroides	C <sub>18</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> N	18.28	302.31	6906.5	11.06	14.65
Estriol	Hormona esteroidea	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	18.28	300.28	4668.1	7.47	3.15
Progesterona	Hormona esteroidea	C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	18.28	318.28	62467.9	100.00	0.95
Serotonina	Neurotransmisor	C <sub>15</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub>	18.28	319.41	16299.5	26.09	198.74
Codeína	Alcaloide	C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> O N <sub>4</sub>	18.29	271.25	3435.7	3.56	0.33
Morphine	Alcaloide	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> N <sub>5</sub>	18.29	268.25	9827.4	10.19	0.68
Nicotine	Alcaloide	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	18.29	282.21	4971.8	5.15	0.07
Buprenorfina	Analgésico	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	18.29	300.2	5808	6.02	1.07
Ketamina	Anestésico	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> O N <sub>2</sub>	18.29	299.31	3258.3	3.38	2.46
Imipramina	Antidepresivo	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	18.29	253.09	4148.4	4.3	1.48
Clorpromazina	Antipsicótico	C <sub>17</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub>	18.29	302.37	9241.5	9.58	84.56
Pentazocina	Analgesico	C <sub>16</sub> H <sub>42</sub> N <sub>6</sub>	18.32	318.36	89165	100	45.47
Ácido elágico	Compuesto fenólico	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	18.32	300.3	8120.2	9.11	5.37
Resveratrol	Compuesto fenólico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> N <sub>3</sub>	18.32	183.03	14074.4	15.78	1.21
Cyclosporina	Inmunosupresor	C <sub>7</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub> N <sub>9</sub>	18.32	267.21	3920.1	4.4	1.88
Tacrolimus	Inmunosupresor	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> O N <sub>10</sub>	18.32	302.23	8938.1	10.02	0.67

Nombre Común	Compuesto Orgánico	Composition	RT	m/z	Intensity	Relative	ppm
<b>Tetracyclina</b>	Antibiótico	C <sub>5</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub> N <sub>8</sub>	18.33	271.15	5385.9	6.15	1.3
<b>Itraconazol</b>	Antifúngico	C <sub>8</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> N <sub>7</sub>	18.33	282.19	6356.3	7.26	1.79
<b>Miconazol</b>	Antifúngico	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	18.33	235.14	6324	7.23	2.05
<b>Clorpromazina</b>	Antipsicótico	C <sub>17</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub>	18.33	302.35	6958.6	7.95	16.74
<b>Testosterona</b>	Hormona esteroidea	C <sub>16</sub> H <sub>42</sub> N <sub>6</sub>	18.33	318.38	87504	100	109.11
<b>Diazepam</b>	Ansiolítico	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub>	18.34	235.18	5480.9	8.72	2.69
<b>Clotrimazol</b>	Antifúngico	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	18.34	253.15	3386.3	5.39	2.49
<b>Verapamilo</b>	Antihipertensivo	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	18.34	268.11	8007.9	12.75	2.29
<b>Ácido caféico</b>	Compuesto fenólico	C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	18.34	289	2978.5	4.74	0.11
<b>Ácido ferúlico</b>	Compuesto fenólico	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	18.34	245.08	2980.5	4.74	1.89
<b>Colesterol</b>	Esteroides	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O	18.34	282.29	3744.4	5.96	6.92
<b>Estrona</b>	Esteroides	C <sub>18</sub> H <sub>42</sub> O N <sub>2</sub>	18.34	302.33	5521.2	8.79	2.51
<b>Ceftriaxona</b>	Antibiótico	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub>	18.67	268.11	15308.8	43.85	2.26
<b>Tetracyclina</b>	Antibiótico	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>8</sub> N <sub>8</sub>	18.67	267.01	34914.5	100	0
<b>Doxorubicina</b>	Anticancerígeno	C <sub>2</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub> N <sub>6</sub>	18.67	249.08	5939.6	17.01	2.5
<b>Resveratrol</b>	Compuesto fenólico	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	18.67	388.04	4920.4	14.09	0.58
<b>Cefuroxima</b>	Antibiótico	C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> N <sub>5</sub>	20.02	223.13	5733.0	17.37	2.11
<b>Metronidazol</b>	Antibiótico	C <sub>4</sub> H <sub>19</sub> O N <sub>9</sub>	20.02	209.17	3512.3	10.64	0.62
<b>Paclitaxel</b>	Anticancerígeno	C <sub>19</sub> H <sub>44</sub> O <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	20.02	520.30	4177.5	12.66	0.86
<b>Imipramina</b>	Antidepresivo	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub> N	20.02	268.14	16564.3	50.19	1.78
<b>Propranolol</b>	Antihipertensivo	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> N <sub>7</sub>	20.02	204.08	4708.7	14.27	1.82

<b>Nombre Común</b>	<b>Compuesto Orgánico</b>	<b>Composition</b>	<b>RT</b>	<b>m/z</b>	<b>Intensity</b>	<b>Relative</b>	<b>ppm</b>
<b>Risperidona</b>	Antipsicótico	$C_{10}H_{15}O_4N_5$	20.02	269.11	4571.2	13.85	0.42
<b>Ácido benzoico</b>	Compuesto fenólico	$C_6H_5O_2$	20.02	136.99	3694.5	11.19	19.85
<b>Ácido elágico</b>	Compuesto fenólico	$C_{13}H_{27}O_6$	20.02	279.18	33001.7	100.00	0.73
<b>Ácido gálico</b>	Compuesto fenólico	$C_5H_5O_4N_3$	20.02	171.03	3593.7	10.89	0.76
<b>Ciclosporina</b>	Inmunosupresor	$C_{30}H_{60}O_3N_9$	20.02	594.48	3678.5	11.15	0.65



Anexo M.- Uso del software Xcalibur para la lectura de cromatograma



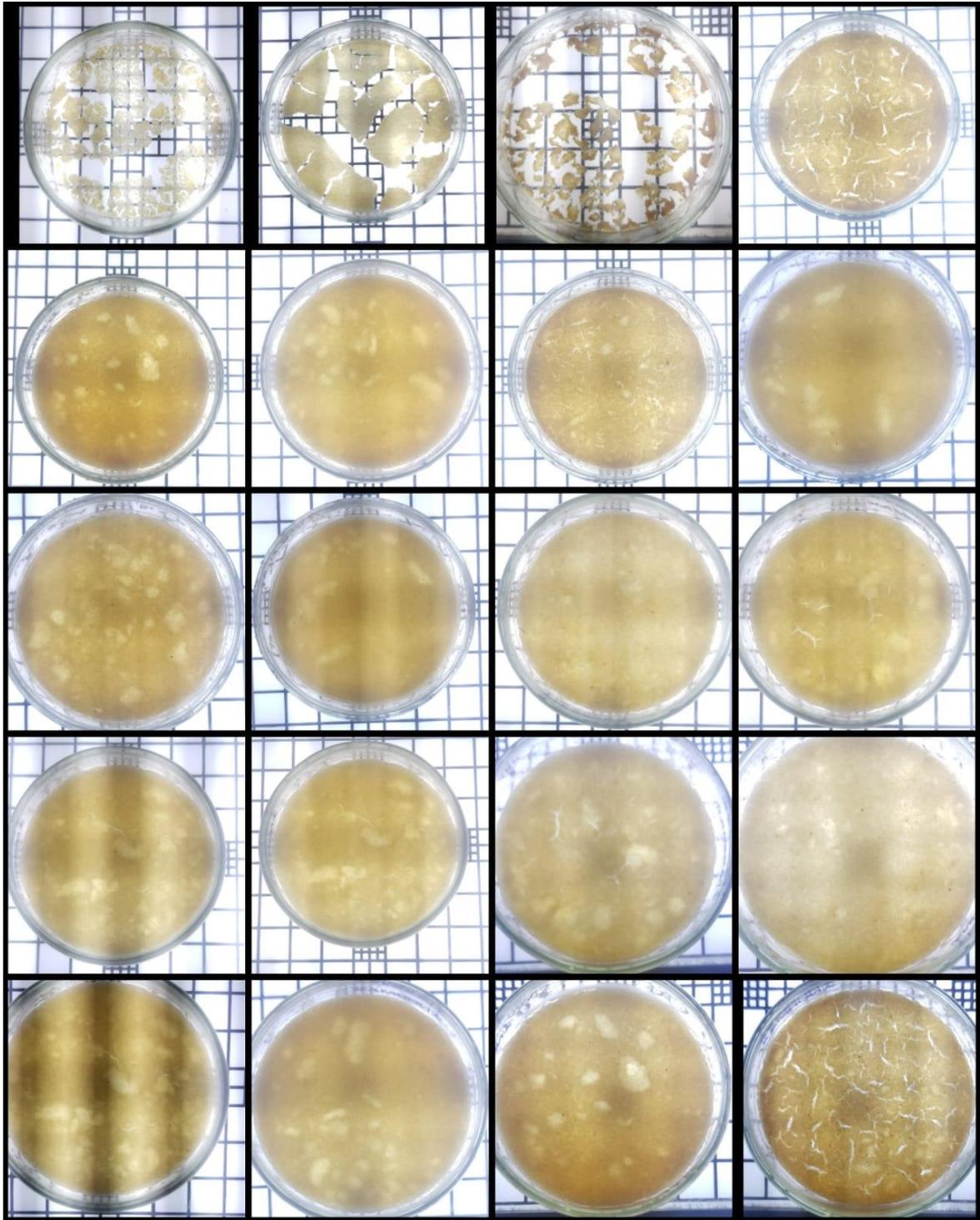
**Anexo N.-** Evaluación microbiológica de la leche cruda con los polifenoles obtenidos en láminas petrifilm



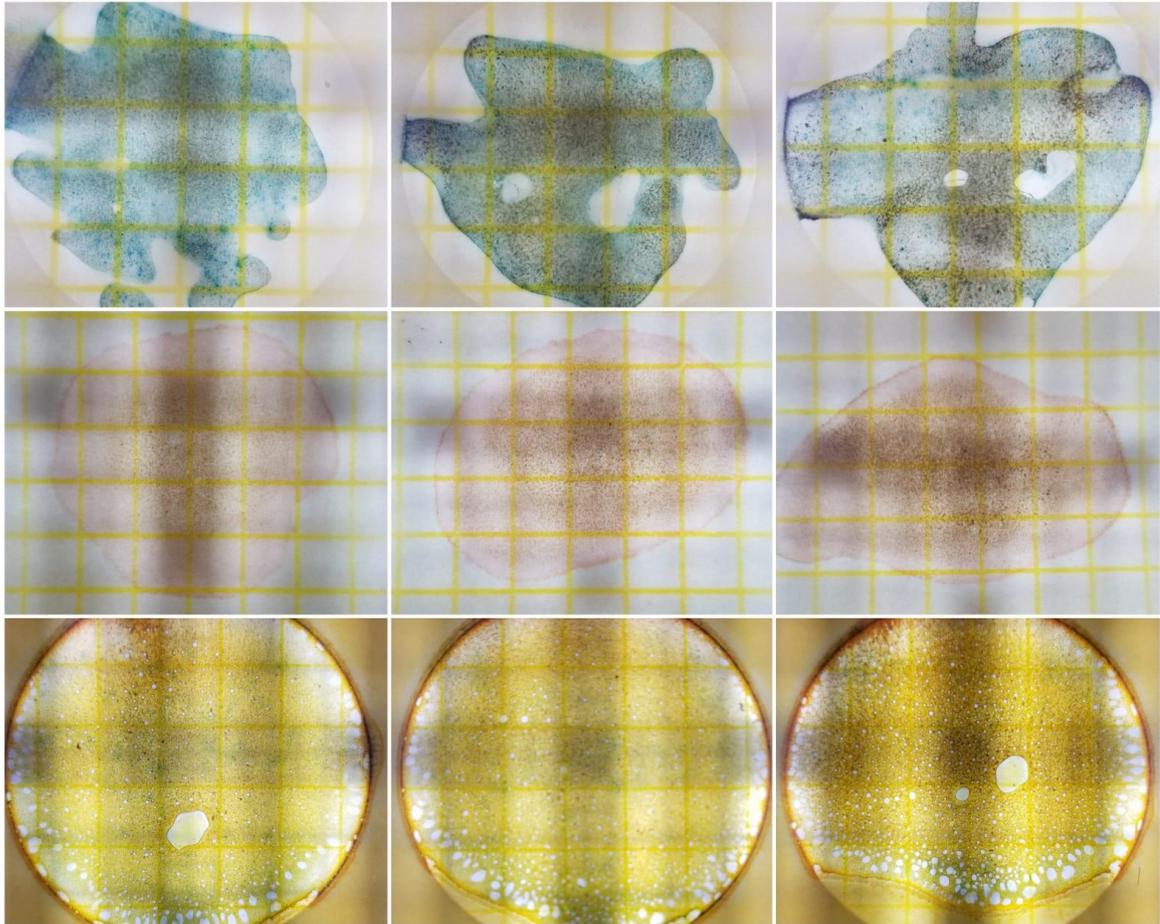
**Anexo O.-** Recuento de UFC en cajas petrifilm



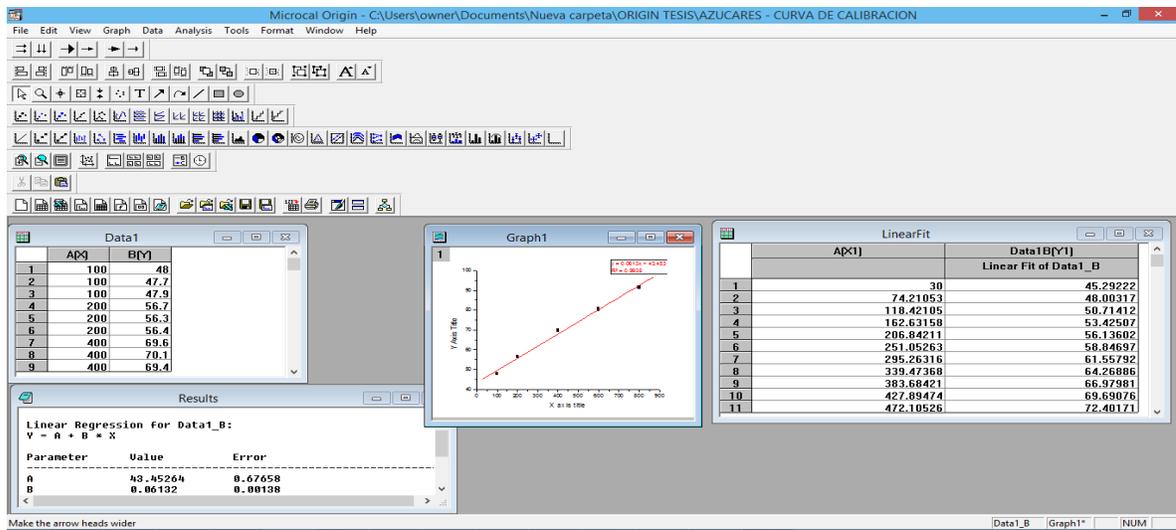
**Anexo P.-** Preparación de muestras y reactivos para los ensayos microbiológicos



**Anexo Q.-** Resultados de cultivos en mohos y levaduras



**Anexo R.-** Resultados obtenidos en láminas petrifilm entre MYL, AE y *E.coli*



**Anexo S.-** Uso del Software Origin para realización de curvas de calibración, desviación estándar, cuantificación, y correlación.