

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del
extracto metanólico de la cáscara del fruto de dos variedades de
Theobroma cacao L. “cacao” del VRAEM. Ayacucho, 2023.**

**Tesis para optar el título profesional de:
Químico Farmacéutico**

**Presentado por:
Bach. Frine Mery Zamora Condori**

**Asesor:
Dr. Edwin Carlos Enciso Roca**

Ayacucho - Perú

2024

Con amor incondicional dedico este trabajo de investigación a nuestro padre Celestial, a mis padres Marino y Antonia, por su apoyo incondicional, amor, orientación; asimismo a mis hermanos por el apoyo moral que me brindaron durante todo el proceso de mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme acogido en sus aulas durante mi formación profesional.

A la plana docente de la E.P. de Farmacia y Bioquímica, por haberme impartido sus conocimientos y experiencias.

A mi asesor Dr. Q.F Edwin Carlos, ENCISO ROCA, por permitirme recurrir a su capacidad, experiencia y el apoyo que me ha demostrado durante el tiempo que duró la investigación.

INDICE GENERAL

	Pág.
ABREVIATURAS EMPLEADAS	ix
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Theobroma cacao</i> L. “cacao”	5
2.3. Compuestos fenólicos	12
2.4. Antioxidantes	15
2.5. Trolox	15
2.6. Aprovechamiento de la cáscara del cacao	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Lugar de ejecución	21
3.2. Definición de la población y muestra	21
3.3. Procedimiento para la recolección de datos	21
3.3.5. Determinación del contenido de fenoles totales	22
3.3.6. Determinación del contenido de flavonoides	23
3.3.7. Determinación de la actividad antioxidante	23
3.4. Análisis de datos	25
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	57

ABREVIATURAS EMPLEADAS

VRAEM	: Valle del Río Apurímac, Ene y Mantaro.
%AA	: Actividad antioxidante porcentual.
mg GAE/g E	: miligramo equivalente a ácido gálico por cada gramo de extracto seco.
mg QE/g E	: miligramo equivalente a quercetina por cada gramo de extracto seco.
μmol ET/g E	: micromol equivalente a trolox por cada gramo de extracto seco.
TPTZ	: 2, 4,6 – tripiridil – triazina.
HCl	: Ácido clorhídrico.
DPPH	: 1,1 – difenil – picril – hidrazilo.
ABTS	: 2, 2' – azino – bis (ácido 3 – etil – benzotiazolin – 6 – sulfónico).
FRAP	: Poder antioxidante redactor del hierro.
ORAC	: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.
TRAP	: Parámetro antioxidante atrapador de radicales totales.
DCFH – DA	: 7' - diclorodihidrofluoresceína diacetato.
DMPD	: N,N – dimetil – <i>p</i> – fenilenediamina.
TPTZ	: 2, 4, 6 – tripiridil – triazina.
FeCl₃	: Cloruro férrico.
HCl	: Ácido clorhídrico.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Composición química de acuerdo al grupo químico presentes en la cáscara de la mazorca (vaina) del <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao".	7
Tabla 2 Estudios farmacológicos realizados al <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao"	8
Tabla 3 Características diferenciales de las variedades de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao", de sus variedades criollo, forastero y trinitario.	10
Tabla 4 Híbridos generados por el Centro de Capacitación Rural – Pichari (CECAR-Pichari)	11
Tabla 5 Clasificación de compuestos fenólicos con respecto al número de carbonos.	12
Tabla 6 Principales ácidos fenólicos.	13
Tabla 7 Clasificación de los métodos analíticos para determinar la actividad antioxidante con respecto al mecanismo de reacción.	17
Tabla 8 Porcentaje de rendimiento del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma. cacao</i> L. "cacao". Ayacucho, 2023.	29
Tabla 9 Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma. cacao</i> L. "cacao". Ayacucho, 2023.	30
Tabla 10 Contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma. cacao</i> L. "cacao". Ayacucho, 2023.	31
Tabla 11 Ensayo de la actividad antioxidante del extracto metanólico de la de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma. cacao</i> L. "cacao".	32
Tabla 12 Concentración inhibitoria (IC ₅₀) del extracto metanólico de la de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma. cacao</i> L. "cacao". Ayacucho, 2024.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Estructura característica del fenol. 12
Figura 2	Mecanismo de reacción de reactivo de Folin-Ciocalteu. 13
Figura 3	Estructura base de un flavonoide. 14
Figura 4	Reacción de los flavonoides con el tricloruro de aluminio. 14
Figura 5	Jerarquía de los compuestos antioxidantes. 15
Figura 6	Estructura del trolox. 16
Figura 7	Reacción de reducción del radical DPPH. 18
Figura 8	Reacción del radical ABTS con un agente antioxidante. 18
Figura 9	Reacción del método de FRAP. 19

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1	Constancia de la clasificación taxonómica 59
Anexo 2	Constancia de la caracterización agronómica de las variedades criollo y trinitario 60
Anexo 3	Flujograma del procedimiento metodológico para recolección de datos. 61
Anexo 4	Recolección de frutos en Mozobamba Alta-Santa Rosa-La Mar-Ayacucho. 62
Anexo 5	Proceso de secado, triturado y extracción metanólica. 63
Anexo 6	Preparación de las soluciones de trabajo. 64
Anexo 7	Procedimiento para el tamizaje fitoquímico, de acuerdo a Miranda y Cuellar. 65
Anexo 8	Flujograma utilizado para poder cuantificar fenoles totales. 66
Anexo 9	Flujograma utilizado para poder cuantificar flavonoides. 67
Anexo 10	Flujograma empleado para determinar la actividad antioxidante mediante DPPH. 68
Anexo 11	Flujograma empleado para determinar la actividad antioxidante mediante ABTS. 69
Anexo 12	Flujograma empleado para determinar la actividad antioxidante mediante FRAP. 70
Anexo 13	Tamizaje realizado al extracto obtenido de las variedades criollo y trinitario. 71
Anexo 14	Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales. 72
Anexo 15	Diluciones del estándar ácido gálico. 72
Anexo 16	Muestras evaluadas en la cuantificación de fenoles totales. 72
Anexo 17	Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides. 73
Anexo 18	Diluciones del estándar quercetina. 73
Anexo 19	Muestras evaluadas para la cuantificación de flavonoides. 73
Anexo 20	Curva de calibración del trolox en el ensayo del radical DPPH. 74
Anexo 21	Diluciones de trolox en el ensayo con el radical DPPH. 74
Anexo 22	Muestras realizadas en el ensayo del radical DPPH. 74
Anexo 23	Curva de calibración del trolox en el ensayo del radical ABTS. 75
Anexo 24	Diluciones de trolox en el ensayo con el radical ABTS. 75
Anexo 25	Muestras realizadas en el ensayo del radical ABTS. 75
Anexo 26	Curva de calibración del trolox en el ensayo del radical FRAP. 76
Anexo 27	Diluciones de trolox en el ensayo con el radical FRAP. 76
Anexo 28	Muestras realizadas en el ensayo del radical FRAP. 76
Anexo 29	Curva para determinar el IC ₅₀ de la variedad criolla con respecto al DPPH. 77
Anexo 30	Curva para determinar el IC ₅₀ de la variedad trinitaria con respecto al DPPH. 77
Anexo 31	Curva para determinar el IC ₅₀ de la variedad criolla con respecto al ABTS. 78
Anexo 32	Curva para determinar el IC ₅₀ de la variedad trinitaria con respecto al ABTS. 78
Anexo 33	Análisis de T-student realizado a la cuantificación de fenoles totales y flavonoides. 79

Anexo 34	Análisis de T-student realizado a la concentración equivalente a trolox en los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP.	80
Anexo 35	Análisis de ANOVA, realizado al IC ₅₀ obtenido mediante los métodos de DPPH y ABTS.	81
Anexo 36	Test de Tukey realizado al IC ₅₀ obtenido mediante los métodos de DPPH y ABTS.	81
Anexo 37	Matriz de consistencia.	82

RESUMEN

El fruto de *Theobroma cacao* L. “cacao”, es utilizado ampliamente en la industria alimentaria, uno de los subproductos es su cáscara, el cual, es rico en compuestos fenólicos que pueden ser aprovechados como fuente potencial de antioxidantes naturales. Por tanto, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante que posee el extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao”, provenientes del VRAEM. La determinación del contenido de fenoles se realizó por el método de Folin Ciocalteu, para flavonoides por el método de tricloruro de aluminio y la actividad antioxidante *in vitro*, fue evaluada mediante los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP. La variedad criolla tuvo un mayor contenido de fenoles totales ($124,90 \pm 2,71$ mg GAE/g) y flavonoides ($58,25 \pm 3,89$ mg QE/g); que la variedad trinitaria ($104,80 \pm 6,25$ mg GAE/g y $51,79 \pm 5,54$ mg QE/g, respectivamente). Asimismo, la variedad criolla también mostró una mejor actividad antioxidante ($235,09 \pm 2,34$; $395,29 \pm 2,44$ y $564,37 \pm 3,64$ μ mol ET/g de muestra, para DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente); así como también el IC₅₀ fue de $1,36 \pm 0,02$ y $0,47 \pm 0,02$ mg/mL en los ensayos de DPPH y ABTS, respectivamente. En conclusión, el extracto metanólico de la cáscara del fruto de *Theobroma cacao* L. “cacao” de la variedad criolla mostró mayor contenido de fenoles totales, flavonoides y mejor actividad antioxidante *in vitro*, que la variedad trinitaria.

Palabra clave: *Theobroma cacao* L. “cacao”, actividad antioxidante, fenoles y flavonoides.

I. INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha incrementado el interés de estudiar la química de los radicales libres y las consecuencias que genera sobre el organismo vivo, estos son compuestos químicos, reactivos de nitrógeno y oxígeno, los cuales son originados por el metabolismo natural de nuestro organismo a través de diversos sistemas como la exposición a condiciones fisicoquímicas o estados patológicos las cuales desencadenan mayor formación de radicales libres, por otro lado, existe una mecanismo antioxidante endógeno propio del organismo que neutraliza los radicales libres generando un equilibrio funcional, sin embargo, al desestabilizar el equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes por el aumento de radicales libres, genera una condición denominada como estrés oxidativo, desencadenando la alteración negativa de los lípidos, las proteínas y el ADN, en consecuencia una serie de enfermedades, es por ello, que la obtención de antioxidantes de una fuente externa ayuda a afrontar este estrés oxidativo¹, esta razón ha intensificado la búsqueda de compuestos naturales con actividad antioxidante. Un grupo de compuestos generados por el metabolismo secundario de las plantas son los polifenoles que cuentan con estudios que respaldan la capacidad antioxidante que poseen mediante mecanismos de inhibición, neutralización o secuestro de los radicales libres.

Se ha determinado la presencia de compuestos fenólicos presentes en la semilla, cáscara de la semilla y la pulpa de fruto de *Theobroma cacao* L. “cacao” que determinan al cacao como un promisorio de especies de compuestos antioxidantes², sin embargo, es a la cáscara del fruto que poco interés se le brinda, pese a que también se le identificaron polifenoles de gran relevancia en cuanto a antioxidantes se trate^{2,3}, así mismo, también posee taninos, alcaloides y terpenos. Por ello, esta investigación está orientado a determinar la actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de *Theobroma cacao* L. “cacao”, conceptualizándose la actividad antioxidante como la propiedad para prevenir o inhibir la oxidación de un sustrato con propiedades oxidables y en el enfoque de la biología es contar con la propiedad para preservar los

sistemas biológicos endógenos, frente a los compuestos que desencadenan su degeneración oxidativa, para el cual, se cuantificó el contenido de fenoles totales y flavonoides; y se determinó su respectiva actividad antioxidante *in vitro* mediante tres ensayos, el secuestro de los radicales libres DPPH y ABTS; y mediante el ensayo FRAP.

Por lo tanto, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao” del VRAEM.

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao” del VRAEM.
- Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao” del VRAEM.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao” del VRAEM, mediante los ensayos DPPH, ABTS y FRAP.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Ginting et al.⁴, realizaron un estudio para determinar la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de la cáscara de cacao de *Theobroma cacao L.*, y el aislamiento de los componentes bioactivos. Se realizó una extracción metanólica por maceración, después del desengrase con n-hexano y finalmente se extrajo con acetato de etilo. Para la actividad antioxidante utilizaron el método de captación del radical libre DPPH, asimismo, se utilizó cromatografía en columna para el aislamiento de los componentes bioactivos el cual fue compuesto por sílica gel como fase estacionaria y n-hexano: acetato de etilo (9:1) como fase móvil. Se obtuvieron siete fracciones, de las cuales presentaron un potencial antioxidante de IC₅₀ dentro del rango 6,46 -91,8 ppm, siendo la más resaltante la fracción 2 (IC₅₀ 6,46 ppm), a esta fracción realizaron una separación cromatográfica en columna obteniendo cuatro fracciones combinadas, donde la fracción combinada 2,4 evidenció un IC₅₀ de 42,7 ppm. Finalmente concluyeron que el extracto de acetato de etilo presenta actividad antioxidante.

Indrianingsih et al.⁵, realizaron un estudio para evaluar la actividad antioxidante, antidiabéticas y antibacterianas del *Theobroma cacao L.*, *Annona muricata* y *Clitoria ternatea*. Con respecto al *Theobroma cacao*, se utilizó la cáscara de los frutos realizándose una extracción metanólica por 24 horas de dos variedades de cacao (morada y amarilla), para la actividad antioxidante se utilizó el ensayo de captación del radical libre DPPH, la cuantificación de fenoles totales se usó el método del reactivo de Folin Ciocalteu, en cuanto la actividad antidiabética se midió por el ensayo de la actividad inhibidora de la α -glucosidasa y para la actividad antibacteriana se utilizó el método de microdilución contra *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 y *Escherichia coli* NBRC 3972. Se obtuvo como resultado que en la actividad antioxidante las variedades amarilla y morada tuvieron mayor capacidad de captación del DPPH con un IC₅₀ de 41,3 y 44, μ g/mL, respectivamente; del mismo modo se reporta un alto contenido de fenoles

totales en la variedad morada (508,78 mg GAE/g de extracto seco). Finalmente, se demostró que todos los extractos inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Concluyeron que las especies vegetales de estudio podrían emplearse como fuente de posibles terapias como antibacterianos, antioxidantes y antidiabéticos.

Martínez et al.², determinaron las propiedades químicas, tecnológicas y antioxidantes *in vitro* de los subproductos obtenidos del cacao (cáscara de la mazorca, cáscara del grano y el mucílago) de la variedad de cacao trinitario, las muestras fueron obtenidas de dos localizaciones pertenecientes a Ecuador (Taura y Cone). Se empleó la técnica del reactivo de Folin Ciocalteu para cuantificar los fenoles totales, con respecto a la actividad antioxidante se utilizaron los métodos de captación del radical libre DPPH y ABTS, como también el método del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). Se obtuvo como resultado para las muestras de la cáscara de la mazorca del cacao 352,67 a 365,33 mg GAE/100g de fenoles totales, en la actividad antioxidante se obtuvo $42,96 \pm 0,15$; $33,93 \pm 0,55$ y $4,49 \pm 0,04$ $\mu\text{m TE/g}$, para DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente.

Rachmawaty et al.⁶, realizaron una investigación acerca de los compuestos bioactivos presentes en la cáscara de la mazorca del cacao y su respectiva actividad antifúngica *in vitro*. Se realizaron extracciones por maceración con acetona-agua (7:3) y etanol al 70%. Para la cuantificación de fenoles totales se empleó la técnica del reactivo de Folin Ciocalteu y obtuvo como resultado 94,92 y 49,92 mg GAE/g de extracto, respectivamente para los solventes acetona-agua t etanol al 70%. Con respecto a componentes químicos obtenidos mediante la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), se reporta en la extracción etanólica la presencia de: octadeca metil-9,12-dienoato, ácido 9-octadecenoico (Z) – éster metílico, ácido hexadecanoico 15 – metil – éster metílico; mientras que, para la extracción con acetona se evidencia la presencia de: miristato de isopropilo, ácido bencenodicarboxílico, ácido 9-octadecenoico (Z) – éster metílico, éster metílico del ácido octadecanoico.

Entre estudios realizados a la semilla de cacao, encontramos a **Enciso et al.**⁷, realizaron un trabajo con el fin de determinar la actividad antioxidante genotoxicidad de las semillas de *Theobroma cacao* L. “cacao”, de las variedades amarilla, roja, cacao 9,9 VRAEM 12, VRAEM 15, CCN-51, criollo y colombiano. Se recolectaron muestras del centro poblado de Manitea del distrito de Kimbiri. Se obtuvo como resultado que la variedad criolla tuvo mayor contenido de fenoles totales (80,43 mg EAG/g), mientras que, la variedad CCN-51 tuvo mayor contenido de flavonoides (49,12 mg EQ/g de extracto seco), con respecto a la actividad antioxidante las variedades VRAEM 15,

criollo, rojo, VRAEM 12 y CNN-51 evidenciaron una mejor actividad antioxidante; asimismo **Ramírez et al.**⁸, evaluaron la actividad antioxidante en genotipos de *Theobroma* spp., en México. Las especies de estudio fueron *Theobroma mammosum* y *Theobroma angustifolium*, *Theobroma bicolor* y *Theobroma cacao*. Se obtuvo como resultado que el *Theobroma cacao* L., en sus genotipos forastero y trinitario criollo, mostraron 33,18; 38,78 y 37,06 mg GAE/g, respectivamente para fenoles totales, siendo superiores a las otras variedades del estudio con excepción del *Theobroma mammosum* (42,05 mg GAE/g). Para la actividad antioxidante evidenció presentar una actividad antioxidante frente a los radicales con 76,78; 69,97 y 68,98 µg EAA/100g, para el ensayo de ABTS y 49,23; 49,8 y 51,5 µg EAA/100 g para el ensayo de DPPH, para los genotipos forastero, trinitario y criollo de *Theobroma cacao* L. "cacao", respectivamente; **Borja et al.**⁹, evaluaron la actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y también la proporción de metilxantinas en cuatro genotipos de *Theobroma cacao* L., de Tolima en Colombia. Como resultado se obtuvo que el contenido fenólico total oscila entre 44,51 ± 0,90 a 106,77 ± 5,21 mg GAE/g y la actividad antioxidante los resultados oscilan de 27,13 ± 0,14 a 56,17 ± 1,74 mmol TE/g, con respecto a los genotipos de *Theobroma cacao* L.

2.2. *Theobroma cacao* L. "cacao"

2.2.1. Clasificación taxonómica

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	: DILLENIIDAE
ORDEN	: MALVALES
FAMILIA	: Sterculiaceae
GÉNERO	: Theobroma
ESPECIE	: <i>Theobroma cacao</i> L.
NOMBRE VULGAR	: "cacao"

Fuente: Constancia emitida por la Blga. Laura Aucasime Medina, especialista en taxonomía y sistemática de plantas (Anexo 1).

2.2.2. Nombres comunes

Entre los nombres comunes más resaltantes tenemos: "abacaraá", "cacahoquáhuil", "kakaobaum", "cacahua", "cacaoyer", "cacaueiro", "bauic", "cacau", "capui", "kakav", "kakaw", "kakao", "cacaeira", etc.¹⁰

2.2.3. Sinonimias¹¹

- *Theobroma cacao* fo. *leiocarpum* (Bernoulli) Ducke
- *Theobroma cacao* L. subsp. *cacao*
- *Theobroma cacao* subsp. *sativum* (Aubl.) León
- *Theobroma cacao* subsp. *sphaerocarpum* (A. Chev.) Cuatrec.
- *Theobroma integerrimum* Stokes
- *Theobroma leiocarpum* Bernoulli
- *Theobroma pentágono* Bernoulli
- *Theobroma kalagua* De Wild.

2.2.4. Descripción botánica

Presenta una raíz pivotante (1,2 a 1,5 cm) y puede profundizarse hasta los 2 m dependiendo del suelo. Tallo glabro, pubescentes presentes en ejes jóvenes de corteza oscura, gris-café. Hojas que crecen son grandes, coloración verde oscuro, peciolo de 1 a 4 cm, pubescentes, presenta polivinilos bien marcados situadas sobre los chupones, se disponen en un tronco de altura (4 a 8 m), de corteza lisa de coloración verde oscuro. Flores hermafroditas, pentámeras y actinomorfas; son originadas y distribuidas por todo el tallo principal y ramas, una longitud (20 mm de diámetro); pedúnculo floral (1-3 cm de largo) agrupados en cojines florales; presenta pétalos y sépalos, de ovario súpero. Fruto mazorca (denomina drupa grande elipsoidal), sostenida por un pedúnculo, de exocarpo conformado de una epidermis de células gruesas y de abundantes tejidos de parénquima, el mesocarpo angosto, formando de parénquima con numerosos canales de mucílago, mientras que, el endocarpo es delgado, parenquimatoso con las paredes internas duras y brillantes. Con semillas (20 a 60 unidades) distribuidas en hileras, ovoides, coloración café claro de 2 a 3 cm de largo y espesor 1 a 1,7 cm; los cotiledones presentan variación de color blanco a púrpura oscuro, estas semillas se encuentran rodeadas de mucílagos blanquecino azucarado. El contenido en un árbol o arbusto semicaducifolio con una altura (12 a 20 m), presenta una corona densa, redondeada de diámetro 7 a 9 m, con un tronco de forma variable. ^{12,13}

2.2.5. Distribución y hábitat

- **Hábitat:** El cacao tiene un hábitat en el interior de bosques lluviosos subtropicales sudamericanos; está área es característico por zonas subtropicales secas a húmedas, así como zonas tropicales muy secas a húmedas, la altitud a la que se cultiva es normalmente a los 300 msnm, y en ambientes boscosos especialmente abrigados de puede desarrollarse a elevaciones de hasta 900 msnm.¹⁴

- **Distribución:** A nivel mundial el cacao tiene una distribución desde la cuenca del Amazonas y las Guyanas hasta el sur de México, posteriormente después de la colonización de América el cultivo se expandió hasta el Caribe, Asia y África; considerado pantropical que se cultiva entre 10°N y 10°S. Por otro lado, en Perú se ha reportado su cultivo en ocho departamentos que son: Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Loreto, Madre de Dios, Piura y San Martín; en una altitud de los 0 – 500 msnm, sin embargo, hay departamentos que presentan un clima más adecuado y son: Ayacucho, Pasco y Ucayali.¹⁴

2.2.6. Composición química

Con respecto a la cáscara de la semilla del cacao, se han cuantificado proteínas, fibra, carbohidratos, polifenoles, etc.¹⁵ (Anexo 3). Con respecto a la cáscara de la mazorca (fruto o vaina), se han cuantificado compuestos fenólicos y derivados (Tabla 1), como también carotenoides, antocianinas y fibras solubles e insolubles; como también minerales resaltan de los que resaltan el manganeso, zinc, hierro cobre y potasio.¹⁶

Tabla 1. Composición química de acuerdo al grupo químico presentes en la cáscara de la mazorca (vaina) del *Theobroma cacao* L. "cacao".

Parte del cacao	Grupo químico	Compuestos químicos identificados	Ref .
Cáscara de la mazorca	Ácidos fenólicos	Ácido vainílico 4-hexósido, -O-siringoil-glucopiranos, ácido protocatequico, bencilo O-[pentosil-hexósido], 5-O-hexósido del ácido gentísico, ácido cumárico	17–20
	Flavonoides		
	Procianidinas	Epicatequina, catequina, (-)-epicatequina, procianidina tipo B,	6,17,18,21
	Flavonoles	Quercetina, quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O – arabinosa, apigenina -7- O – glucurónido, 6,8-C-dihexosilapigenina, Glucosil-6-C-arabinosilapigenina, 6-C-Glucosil-8-C-arabinosilapigenina, 3-glucurónido de kaempferol, 3- O -pentósido de kaempferol, ramnetina.	17–19
	Flavanona	Linarina (acacetina)	19
	Otros	Derivados de la sineginhomoorientina,	
	Otros		
	Alcaloides	Teobromina, cafeína	21
	Ácidos grasos	Ácido 9-octadecenoico (Z) – éster metílico,	6,21
	Terpenoides	Crisoplenol	19
	Aminoácidos	Metoxitirosina, maloniltryptófano, N-acetyltryptófano,	17
	Otros	Octadeca metil-9,12-dienoato, ácido hexadecanoico 15 – metil – éster metílico, miristato de isopropilo.	6,21

2.2.7. Estudios farmacológicos realizados

En general el cacao cuenta con diversos estudios farmacológicos realizados a partir de las diferentes partes que presenta como la corteza del tallo, hojas, semillas, cáscara de la semilla y cáscara de la mazorca. (Tabla 2)

Tabla 2. Estudios farmacológicos realizados al *Theobroma cacao* L. “cacao”.

Parte del cacao	Actividad farmacológica	Ref.
Corteza del tallo	Antiinflamatoria	22
Hojas	Antihelmíntico	23
	Antimalárica	24
	Antihipertensiva	25
		2,25–27
Semillas (granos de cacao)	Antioxidante	
		28
Cáscara de la semilla (cascarilla)	Anticancerígena	
	Antioxidante	2,7,29
Cáscara de la mazorca (vaina)	Antioxidante	2,5,16–19,21,29,30
	Antimicrobiano	5,31
	Antidiabético	5

2.2.8. Propiedades y usos medicinales

El empleo tradicional del cacao y chocolate, eran como energizantes y tónico para prevenir enfermedades; otros lo utilizaban como vehículo para administrar medicinas para obtener la estimulación del apetito, aumentar la resistencia física y disminuir la fatiga. Se describe también en combinación con el líquido de la corteza del algodón de seda (*Castilloa elástica* Cerv.), esta combinación se utilizaba para dolores estomacales e intestinales, como también para infecciones. Las semillas del cacao en combinación con maíz y la hierba “tlacoxóchitl” *Calliandra anómala*, funcionaba para aliviar fiebre, respiración jadeante y la debilidad del corazón. Las flores eran utilizadas como ingrediente en baños terapéuticos que curaban la fatiga.¹⁰ Por otro lado, se reporta que dentro de los componentes tenemos a la teobromina que es un componente más diurético que la cafeína y relajante muscular, también se menciona la teofilina que tiene efectos vasodilatadora fuerte, así mismo dentro de los flavonoides tenemos al flavonol epicatequina que es responsable de un efecto beneficioso y protector en el desarrollo del infarto de miocardio, cáncer, diabetes y apoplejía.³²

2.2.9. Variedades de cacao

Desde un punto de vista botánico, el *Theobroma cacao* L. “cacao”, se clasifica en:

a. Criollo

Originaria de América Central (precolombina), considerada en Europa como la primera variedad que fue introducida por los primeros colonizadores. Contemporáneamente es

una especie que se cultiva en grandes cantidades en Guatemala, Nicaragua y México: por otro lado, en pequeñas cantidades en Colombia, Trinidad, Venezuela, Perú, Jamaica, islas del Caribe e isla de Granada. Su forma arbórea es débil, con el crecimiento lento, rendimiento bajo, alta susceptibilidad a enfermedades (plagas), sin embargo, el fruto que desarrolla presenta la cualidad de ser dulce y por ello el chocolate es menos amargo con una mejor calidad; presenta sabor suave, delicado y complejo; intenso aroma es, por estos detalles hacen a esta variedad de cacao exclusivo contando con alta demanda en los mercados con mayor exigencia del mundo. Entre los rasgos botánicos característicos se indica que se presentan como árboles de porte bajo con menos robustes. Caracterizados por poseer un fruto alargado de punta pronunciada, doblada y aguda; con una superficie es rugosa, delgada, de coloración verdosa con salpicaduras de rojo a púrpura oscuro y marcada por 10 surcos muy profundos; los granos son grandes, gruesos, de sección casi redonda con los cotiledones blancos o muy ligeramente pigmentado, presentan semillas blancas, rosadas y gruesas, producen granos con sabor suaves y aromáticos. Actualmente no existe cacao criollo puro sino de variedades acriolladas debido a que han tenido varios cruces con otras variedades.^{33,34}

b. Forastero

Su origen es en la Alta Amazonía, es la variedad que más se produce en África y Asia, debido a que presenta gran resistencia y poca aromaticidad; usado esencialmente para dar cuerpo al producto final del chocolate. Se introdujo en Latinoamérica por los europeos en los territorios pertenecientes a sus colonias, como respuesta a la creciente demanda de chocolate a principios del siglo XX. Algunos lo consideran como un cacao fuerte y amargo con características ácidas y astringentes; esto se debe a la presencia de tanino y astringencia, sobresaliendo su gran aromaticidad, asimismo presenta alto rendimiento, cosecha adelantada, y su capacidad de resistir a enfermedades. En cuanto a sus características botánicas esta variedad se presenta como fruto verde, pericarpio grueso, mesocarpio lignificado, las semillas son redondas, aplanadas, de cotiledones violetas.^{34,35}

c. Trinitario

Esta variedad se considera un híbrido del Forastero y el Criollo, proveniente de la isla Trinidad, no hubo reporte de encontrarse en estado silvestre. Se dispó en El Caribe y América Latina, posteriormente insertado en el continente africano por el año de 1850. Presenta mayor aromaticidad que la variedad forastera y con alta resistencia superior a la variedad criolla, dentro de la producción mundial la variedad trinitaria se encuentra en

el 10% -15%. Una subvariedad es el cacao CCN-51, un cacao común proveniente del Naranjal (Guayas-Ecuador).³⁴ Presenta semillas grandes en comparación al criollo y forastero; sus mazorcas presentan variabilidad en formas y colores, de troncos grandes y gruesos.³⁶ Entre las principales partes del fruto que determinan diferencias están la semilla, fruto y sus propiedades agroindustriales. (Tabla 3)

Tabla 3. Características diferenciales de las variedades de *Theobroma cacao* L. "cacao", de sus variedades criollo, forastero y trinitario.³⁴

Órgano / carácter	criollo	Forastero	trinitario
Semilla			
Color de cotiledones	Blanco o violeta	Morado, blanco	Morado
Forma (sec. Transversal)	Redondeada	Aplanado o intermediaria	Variable
Fruto			
Color (estado inmaduro)	Rojo o verde	Verde o verde pigmentado	Rojo o verde
Rugosidad	Rugosos o ligeramente liso	Liso o medio	Variable
Constricción basal	Ausente o ligero	Variable	Variable
Grosos de cascara	Delgado - media	Gruesa o media	Delgada o media
Numero de semillas	20-40	20 – 60	30 - 45
Agroindustrial			
Inicio de producción	4-6 años	3 – 5 años	3 – 4 años
Periodo de fermentación	3 - 4 días	5 – 7 días	5 – 6 días
Sabor y aroma	Extrafino-fino	Corriente	Fino - medio
Contenido de grasa	Bajo (< 54%)	Variable (45 – 60 %)	Variable (45 – 57%)

2.2.10. Clones del cacao

Son especies con una similar composición hereditaria, originado a partir de una planta madre específica, obtenido por una reproducción asexual (acodos, injertos o estacas), esta presenta su material genético uniforme que deriva de un solo individuo obtenido de modo exclusivo.

Entre los clones de mayor relevancia descritos por Alarcon³⁷, se tienen:

Clones Internacionales

Se identifican los principales como:

- CCN-51 (Colección Castro Naranjal – 51), que es originario de Naranjal-Ecuador, obtenido a partir de cacao híbrido).
- ICS-95 (Imperial College Selection – 95), originario de las Islas Trinidad y Tobago.

Clones nacionales

- CMP (Colección Mendis Paredes), procedente de Huánuco-Tingo María, como la CMP-91 y la CMP-92.

Clones locales

- CMP (Colección Mendis Paredes), procedente de Cusco-La Convención (CMP-02), Ayacucho-La Mar-Anco (CMP-06), Ayacucho-La Mar-Santa Rosa-Palmapampa (CMP-12), Ayacucho-La Mar-Santa Rosa-Cumunpiari (CMP-15), Cusco-La Convención-Kimbiri (CMP-40), Ayacucho-La Mar-Ayna-Siato (CMP-44), Ayacucho-La Mar-Sivia-Kimpitiriki Alta (CMP-81), Ayacucho-La Mar-Sivia-Puerto Acón (CMP-86).

Por otro lado, entre los principales clones identificados en el VRAEM, descritos por Gamboa³⁶ y Bioversity Internacional³⁸, se tienen:

- Clon IMC-67 (Iquitos Mezclado con Calabacillo)
- Clon TSH-565 (Híbrido Seleccionado en Trinidad)
- Clon UF-221 (Compañía Frutos Unidos)
- Clon CCN-51 (Colección Castro Naranjal)
- Clones VRAE (Valle del Río Apurímac y Ene), tenemos: VRAE-99, VRAE-15, VRAE-81, VRAE-52, VRAE-49, VRAE-12, VRAE-92, VRAE-6, VRAE-2.

Nuevos clones obtenidos en la estación Perla del VRAEM dirigido por la Ing. Montañez³⁸, tenemos:

- INIA – Perla del VRAEM, clones SAR-1, UF-237, JGL-1, JGL-2, JGL-3, VRAE-44, Gustavo, Juan Talavera, GST-01, CVT, GST-02.

Los principales híbridos generados en Pichari, por el Centro de Capacitación Rural (CECAR-Pichari), para la distribución en el VRAE según el M&O Consulting S.A.C., se identificaron a 10 híbridos. (Tabla 4)

Tabla 4. Híbridos generados por el Centro de Capacitación Rural – Pichari (CECAR-Pichari).³⁹

N°	Progenitores
1	ICS-95 X IMC-67
2	ICS-95 X SCA-6
3	ICS-95 X POUNSD-7
4	EET-400 X IMC-67
5	ICS-95 X POUND-12
6	ICS-1 X POUND-12
7	ICS-6 X SCA-6
8	ICS-39 X POUND-7
9	UF-613 X IMC-67
10	UF-29 X IMC-67

2.3. Compuestos fenólicos

Son compuestos caracterizados por presentar un anillo aromático (benceno) unido a un radical hidroxilo. (Figura 1) Se les denomina polifenoles, fenilpropanoides o compuestos fenólicos⁴⁰, estas moléculas se sintetizan en las plantas a través de la ruta del ácido shikímico, a su vez cumplen una función en el metabolismo desde la etapa del crecimiento, reproducción participando en labores como protector frente a agentes patógenos externos y estrés oxidativo ocasionado por la radiación UV y los depredadores.⁴¹

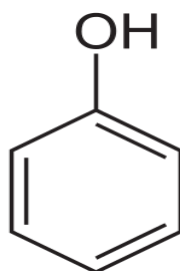


Figura 1. Estructura característica del fenol.⁴¹

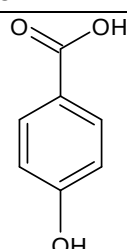
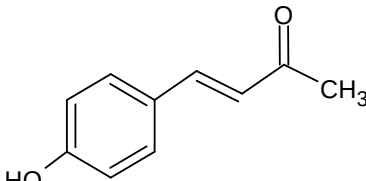
2.3.1. Compuestos fenólicos no flavonoides

Se pueden clasificar de acuerdo al número de carbonos que presentan en su núcleo básico (Tabla 5) y en los ácidos fenólicos, según el núcleo que las dan origen (Tabla 6).

Tabla 5. Clasificación de compuestos fenólicos con respecto al número de carbonos.⁴²

Esqueleto básico	Clases	Ejemplos
C ₆	Fenoles.	Catecol, hidroquinona
C ₆ – C ₁	Ácidos fenólicos.	Ácido gálico, ácido salicílico
C ₆ – C ₂	Acetofenona, derivados de la tirosina, ácidos fenilacéticos.	Ácido p – hidroxifenilacético, tirosol, 3 – acetil – 6 – metoxibenzaldehído
C ₆ – C ₃	Ácido hidroxicinámico, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas.	Ácido cafeico, ácido ferúlico, miristicina, eugenol, umbeliferona, esculetina
C ₆ – C ₄	Naftoquinonas.	Juglona, plumbagina
C ₆ – C ₁ – C ₆	Xantonas	Mangiferina
C ₆ – C ₂ – C ₆	Estilbenos, antraquinona	Resveratrol, emodina
C ₆ – C ₃ – C ₆	Flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides	Quercetina, cianidina, genisteína
(C ₆ – C ₃) ₂	Lignanós, neolignanós	Pinoresinol, eusiderina
(C ₆ – C ₃ – C ₆) ₂	Biflavonoides	Amentoflavona
(C ₆ – C ₃) _n ; (C ₆) _n ; (C ₆ – C ₃ – C ₆) _n	Ligninas, melaninas, flavolanos	Polímeros fenólicos

Tabla 6. Principales ácidos fenólicos.⁴²

Núcleo	Sustituciones presentes		Ácido fenólico
 Acido-4-hidroxibenzoico	R₁	R₂	ácido fenólico
	H	H	ácido p-hidroxibenzoico
	OCH ₃	H	ácido vanílico
	OH	OH	ácido gálico
	OCH ₃	OCH ₃	ácido siríngico
 Acido-p-hidroxicinamico	R₁	R₂	Ácido fenólico
	O	H	acido p-cumárico
	OH	H	ácido cafeico
	OCH ₃	H	ácido ferúlico
	OCH ₃	OCH ₃	ácido sináptico

2.3.2. Método de Folin-Ciocalteu

Utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, que no es específico para fenoles. De hecho, el ensayo de Folin-Ciocalteu cuantifica aptitud de reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotungstico hasta formar un complejo de coloración azul, es decir, el ensayo se fundamenta en la formación del ión fenolato que reduce Folin-Ciocalteu ($W^{+6} Mo^{+6}$) a ($W^{+5} Mo^{+5}$), cuantificado mediante técnicas espectrofotométricas a 765nm.⁴³ (Figura 2)

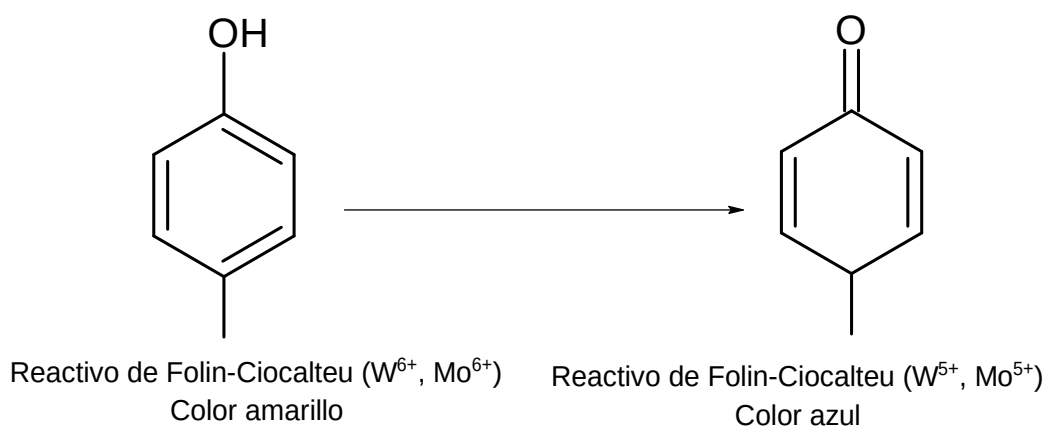


Figura 2. Mecanismo de reacción de reactivo de Folin-Ciocalteu.⁴⁴

2.3.3. Flavonoides

Son una sub clase derivados de los compuestos fenólicos, estas abarcan un grupo amplio de compuestos sintetizados por el metabolismo secundario de las plantas, a partir de la ruta del ácido shikímico y vía de los policétidos, estos presentan una estructura característica fenil-benzo- γ -pirona o fenil- γ -cromona, conocidos también como compuestos fenólicos diaril-13 propánicos por la presentación estructural de tipo $C_6-C_3-C_6$ (bencénicos) enlazados entre sí por una secuencia de tres carbonos formando un ciclo con el oxígeno. La ruta de los policétidos forma el anillo A, mientras que la ruta del ácido shikímico forma el anillo B y C.^{45,46} (Figura 3)

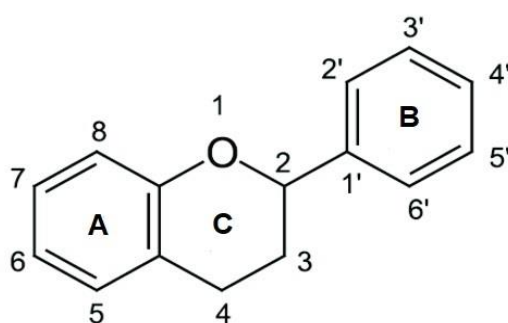


Figura 3. Estructura base de un flavonoide.⁴⁶

2.3.4. Método de tricloruro de aluminio

Técnica colorimétrica descrita por Harborne (1954), fue empleado en la determinación de antocianinas, paso el tiempo fue utilizado para cuantificar los flavonoides espectrofotométrico. La reacción se fundamenta en la formación de complejos estables mediante la interacción del aluminio con los hidroxilos del compuesto flavonoide. (Figura 4)

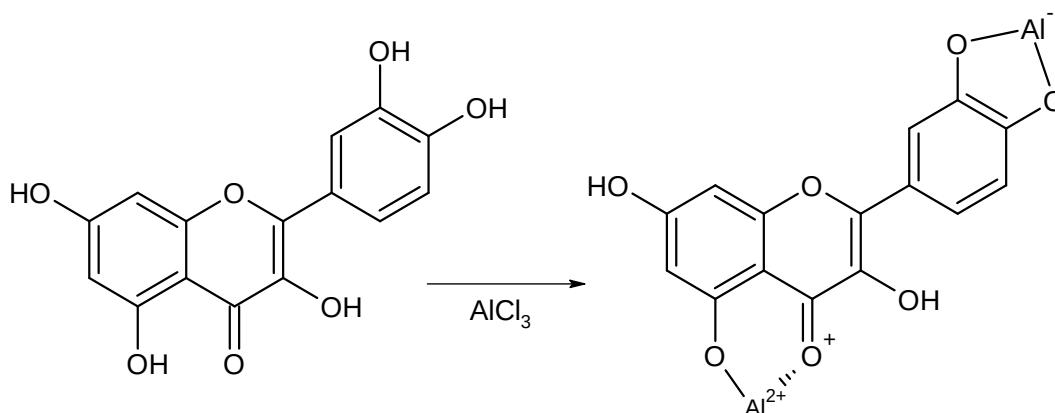


Figura 4. Reacción de los flavonoides con el tricloruro de aluminio.⁴⁷

2.4. Antioxidantes

Se consideran a los compuestos antioxidantes a toda sustancia o especie química que tienen la capacidad de prevenir y retrasar la oxidación de cualquier sustrato susceptible a oxidación pese de encontrarse a concentraciones inferiores con respecto al sustrato oxidable. Nuestro organismo cuenta con una línea de defensa de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos; las cuales por sinergismo actúa para neutralizar las diferentes especies reactivas del oxígeno⁴⁸, estas especies antioxidantes presenta una jerarquía de acuerdo a su efecto protector. (Figura 5)

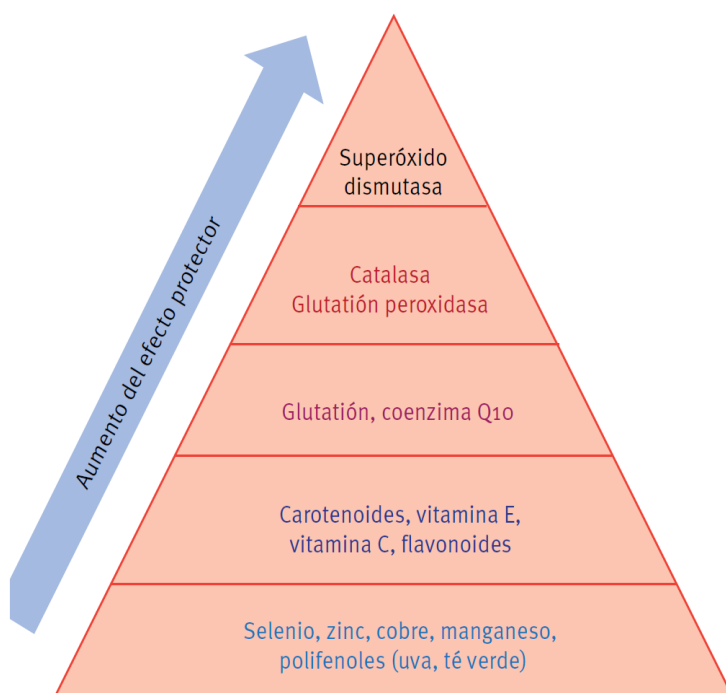


Figura 5. Jerarquía de los compuestos antioxidantes.⁴⁸

Con respecto a los polifenoles son considerados como potentes antioxidantes obtenidos a través de la dieta vegetal proveniente de fuente exógena, estos son capaces de eliminar los radicales superóxidos, radicales, lipídicos y $^1\text{O}_2$; así mismo, estos son capaces de lograr la estimulación para inducir la producción de enzimas antioxidantes, esencialmente el superóxido dismutasa.^{48,49}

2.5. Trolox

Es una molécula análoga de la vitamina E (alfa-tocoferol) (Figura 6), con característica soluble en agua y de fácil accesibilidad comercial, es utilizado como estándar de referencia para ensayos de miden la capacidad y/o actividad antioxidante (como DPPH, FRAP, ABTS, ORAC), los resultados que se obtengan son representados como

micromoles de Equivalentes Trolox ($\mu\text{mol ET}$) por cada unidad de peso o unidad de volumen de la respectiva muestra.⁵⁰

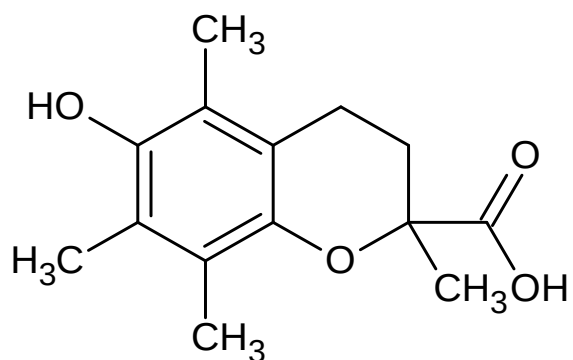


Figura 6. Estructura del trolox.⁵⁰

2.5.1. Métodos para determinar la actividad antioxidante

Los mecanismos de acción de los agentes antioxidantes se desarrollan como: secuestro o captura de RL, reducción mediante donación de electrones, formación de quelatos con metales, dinamización de sistemas antioxidantes endógenos (biológicos); un extracto es mezcla de diversos compuestos químicos bioactivos y cada uno cuenta con un mecanismo antioxidante de acuerdo a su naturaleza química, sin embargo, se produce un sinergismo en la actividad antioxidante, por ello, se necesita diferentes métodos de análisis para definir un mecanismo de acción de los agentes antioxidantes contenidos en un extracto.⁵¹

De acuerdo al mecanismo de reacción los antioxidantes se clasifican en primero por la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) que son: ORAC, TRAP, DCFH-DA, ensayo de crocina; otro mecanismo es la transferencia de electrones (TE) que son: FRAP, DPPH y DMPB; mientras que, el ensayo de ABTS cumple un mecanismo mixto de TE y TAH.⁵²

Tabla 7. Clasificación de los métodos analíticos para determinar la actividad antioxidante con respecto al mecanismo de reacción.

Categoría	Ensayo	Medida	Técnica
Transferencia de átomos de hidrogeno (TAH)	Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC).	Inhibición de la caída de fluorescencia de PE/FL.	Fluorimetría
	Parámetro antioxidante de captura total de radicales (TRAP).	Oxígeno consumido	Electrodo de oxígeno
	DCFH-DA	Inhibición de oxidación de DCFH-DA	Espectrofotometría-fluorimetría
	Ensayo crocino	inhibición de oxidación de crocina	Espectrofotometría
Transferencia de electrones (TEC)	Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)	Reducción TPTZ-Fe ³⁺ a TPTZ-Fe ²⁺	Espectrofotometría
	1,1-DIFENIL-2-picril-hidrazilo (DPPH)	Reducción del radical DPPH	Espectrofotometría
	N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPB).	Reducción del DMPB	Espectrofotometría
Mixtos (TAH Y TE)	Acido 2,2· azino- bis (3- etilbenzotiazolin)-6- sulfónico (ABTS*+)	Descenso de ABTS*	Espectrofotometría

2.5.1.1. Método del secuestro del radical libre DPPH

El DPPH es un radical libre (RL) estable, sustancia comúnmente utilizada para determinar el poder antioxidante de agentes químicos con características antioxidantes, el DPPH se presenta en solución de una coloración violeta oscuro, luego de reaccionar con el compuesto antioxidante se produce la reducción del DPPH, manifestándose una coloración amarilla pálida; esto se debe a que el compuesto antioxidante fue el donador de átomos de hidrógeno. Se utilizan técnicas espectrofotométricas con lecturas a 517 nm para verificar variación de la absorbancia y determinar parámetros que abalen las propiedades antioxidantes.⁵³ (Figura 7)

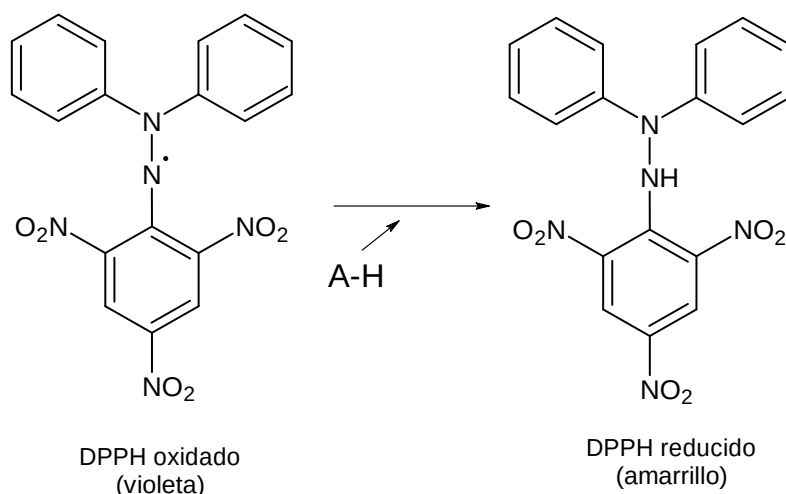


Figura 7. Reacción de reducción del radical DPPH.⁵⁴

2.5.1.2. Método secuestroamiento del radical ABTS

El método se fundamenta en la formación del catión libre (cromóforo) $ABTS^{\bullet+}$ de coloración verde-azul (formado por la reacción del ABTS y persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$)). A través de la interacción de un agente antioxidante se produce la reducción del $ABTS^{\bullet+}$ disminuyendo la coloración hasta tornarse incolora, utilizando técnicas espectrofotométricas (734 nm), se mide el grado de decoloración generado por el antioxidante, brindando como dato el porcentaje de inhibición del radical ABTS.⁵⁵(Figura 8)

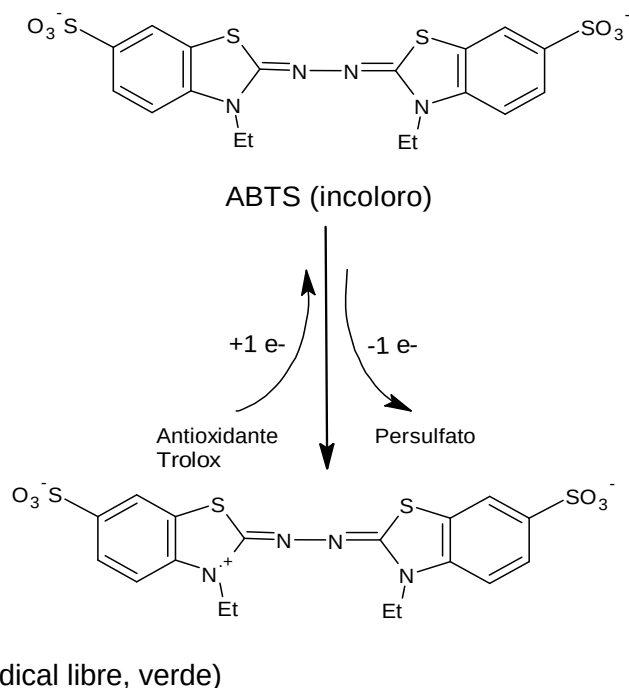
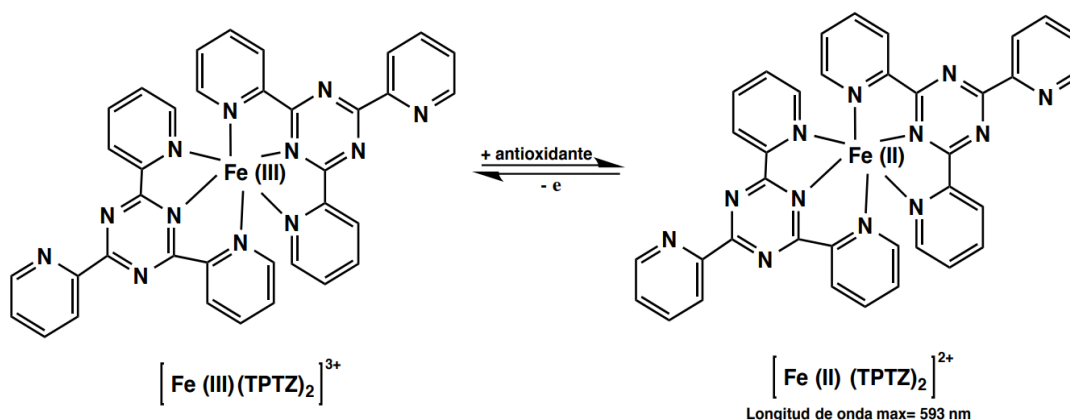


Figura 8. Reacción del radical ABTS con un agente antioxidante.⁵⁶

2.5.1.3. Método de FRAP

El método se fundamenta mediante la reducción de un complejo formado por un cromógeno (TPTZ), en solución con el hierro férrico (Fe^{3+}), reacción característica mediante el cambio de coloración incolora a un complejo ferroso de coloración violáceo oscuro; en presencia de antioxidantes en un medio ácido. El ensayo es simple y barato, puede ser utilizado para evaluar diferentes compuestos antioxidantes no enzimáticos, no obstante, no mide a los agentes antioxidantes que presente grupos SH, como el ácido lipoico, glutatión y algunos aminoácidos, puesto que estos no reducen de forma eficiente de Fe^{3+} a Fe^{2+} .⁵² (Figura 9)

Reducción ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$)



Incoloro Fe $\rightarrow$ Azul intenso

Figura 9. Reacción del método de FRAP.⁴³

2.6. Aprovechamiento de la cáscara del cacao

Los residuos de la industria del cacao están formados por partes no usadas, los cuales son denominados subproductos, como la cáscara de la mazorca del cacao, este subproducto constituye del 67 a 76% del peso neto del fruto del cacao, lo que industrialmente se desechan cantidades considerables como residuo, esto se considera como una importante oportunidad económica y ambientalmente podría ser renovable, por ello, en el marco del aprovechamiento sostenible de todo el fruto de cacao se enmarca en la economía circular y de esta manera destinar el uso de la cáscara del fruto de cacao con otros fines, como en la agricultura como base para fertilizar el suelo, elaboración de harina de cáscara de cacao, aprovechamiento de los polifenoles contenidos en la cáscara de cacao, elaboración de compost, para conseguir ello es necesario la utilización de tecnología de extracción ecológicas (extracción con agua

subcrítica o con fluidos supercríticos), estas técnicas suponen un medio sostenible y con mínimo impacto sobre el medio ambiente.^{57,58}

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

Se desarrolló en los ambientes de Farmacia y Bioquímica, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Salud, durante el periodo de agosto a diciembre de 2023.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población

Cáscara del fruto (mazorca) de *Theobroma cacao* L. “cacao”, variedad criollo y trinitario, procedente del anexo de Mozobamba Alta (coordenadas 12°42'54.90328” S – 73°41'42.57192” W – 22N), a una altitud de 1102,2 msnm, distrito de Santa Rosa – VRAEM, provincia de La Mar, región Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Un kilogramo de cáscara de las variedades criollo y trinitario, recolectadas en el mes de agosto de 2023. Se realizó un muestreo por conveniencia, considerando evitar daños físicos a la mazorca del fruto de cacao.

3.2.3. Unidad de análisis

Extracto metanólico desecado de la cáscara.

3.3. Procedimiento para la recolección de datos

3.3.1. Selección, recolección y desecación del material vegetal

Los frutos de *Theobroma cacao* L. “cacao”, fueron recolectados en horas de la mañana seleccionándose los frutos que se encuentren en buen estado. Fueron conservadas para ser trasladadas hasta el laboratorio Toxicología de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, y las partes aéreas fueron destinadas para su identificación taxonómica por la bióloga Laura Aucasime Medina, por otro lado, otra muestra derivada

con el Ing. Fredy Prado Maciso para la caracterización agronómica de los frutos de cacao (Anexo 1, 2, 3 y 4).

3.3.2. Desecación

Se procedió con el descascarado del fruto de cacao, luego se continuó con la reducción del tamaño de la cáscara y fueron colocados sobre un recipiente de aluminio para el secado correspondiente a temperatura ambiente y bien conservados, posteriormente las partes reducidas de la cáscara fueron molidas utilizando la licuadora hasta obtener un polvo fino (Anexo 5).

3.3.3. Obtención del extracto metanólico

Se tomó 10 g de muestra pulverizada, se colocó en un matraz con 100 mL de metanol para una extracción dinámica por un período de cuatro horas utilizando un agitador mecánico, realizando el proceso dos veces, se filtró el extracto y se llevará a un rotavapor hasta la evaporación del solvente, luego se llevó a estufa (35 °C) hasta obtener un extracto seco el cuál será preservado en un contenedor de color ámbar a temperatura a 4 °C, hasta su uso⁵⁹ (Anexo 5 y 6).

3.3.4. Tamizaje fitoquímico

Se siguió el procedimiento que describe Miranda⁶⁰, donde las reacciones usuales son de coloración y precipitación para reconocer cualitativamente a los metabolitos secundarios que están presentes en la extracción obtenida. (Anexo 7)

3.3.5. Determinación del contenido de fenoles totales

Se siguió el procedimiento utilizando el método del reactivo Folin – Ciocalteu (FC), descrito por Swain y Hillis (1959), adaptado por Zhishen *et al.*⁶¹, que indica lo siguiente: Se utilizó la muestra disuelta en metanol (1 mg/mL) (ST), se tomó 150 µL de la ST con 150 µL de reactivo FC (0,25 N), con 2400 µL de H₂O_(d) (agua destilada), se mezcló por 5 minutos dejándose por 3 minutos. Después se añadió 300 µL de solución de Na₂CO₃ (carbonato de sodio) (1 N). Se incubó en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro UV – VIS, a una longitud de onda de 725 nm contra un blanco de reacción. Se elaboró una curva de calibración con el ácido gálico (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 µg/mL). Las pruebas fueron realizadas por tres repeticiones, se expresaron mg GAE/g de E. (Anexo 8, 14, 15 y 16).

3.3.6. Determinación del contenido de flavonoides

Se siguió el procedimiento según el método del cloruro férrico, detallado por Zhishen *et al.*⁶².

Se utilizó la muestra disuelta en metanol (1 mg/mL) (ST). Se tomó 500 µL de ST con 500 µL de H₂O_(d) y 150 µL de NaNO₂ (nitrito de sodio) al (5%), después de 5 minutos, se adicionó 150 µL de AlCl₃ (cloruro de aluminio) al (10%), pasado 6 minutos se añadió 2 mL de NaOH (hidróxido de sodio) al (4%), se completó el tubo de ensayo hasta 5 mL con H₂O_(d) y se llevó a un vortex; posteriormente se dejó en reposo durante 15 minutos en un ambiente carente de luz. Se realizará las lecturas en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 510 nm, contra un blanco de reacción. Se realizó una curva de calibración con la quercetina como estándar (40,0; 80,0; 120,0; 160,0; 200,0 µg/mL). Las pruebas fueron realizadas por tres repeticiones, se expresaron mg QE/g E. (Anexo 9, 17, 18, 19)

3.3.7. Determinación de la actividad antioxidante

3.3.7.1. Método del secuestro del radical libre DPPH

Se siguió el método elaborado por Brand – Williams (1995), adaptado por Thaipong *et al.*⁶¹, el cual también se adaptó a las condiciones del laboratorio utilizado.

Se utilizó la muestra disuelta en metanol (1 mg/mL). Se preparó una solución stock (SS) del DPPH en metanol (20 mg/mL), ajustándose la absorbancia a $1,1 \pm 0,2$ con metanol a 517 nm. A 500 µL de la muestra se añadió 2000 µL de la SS de DPPH homogenizándose en vortex. Se incubó en oscuridad durante 30 minutos, posteriormente se realizaron lecturas a 517nm. La actividad secuestradora porcentual del DPPH se determinó con la siguiente fórmula:

$$\%AA = \left[\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{M_p}}{Abs_{DPPH}} \right] \times 100$$

Donde:

%AA: Porcentaje de actividad secuestradora del DPPH.

Abs_{DPPH}: Absorbancia del DPPH.

Abs_{M_p}: Absorbancia de la muestra.

Asimismo, se preparó una curva estándar con Trolox (25 – 800 µmol), las pruebas fueron realizadas por tres repeticiones y se expresaron en mg µmol ET/g E. (Anexo 10, 20, 21 y 22). La concentración mínima inhibitoria (IC₅₀) (Anexo 29 y 30), se determinó la

concentración mínima necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH, por lo que, se preparó 0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL de extracto metanólico y se calculó mediante:

$$\% \text{ inhibición del DPPH} = (\text{Abs}_c - \text{Abs}_{Mp}) / \text{Abs}_c \times 100$$

Abs_c = Absorbancia control

Abs_{Mp} = Absorbancia de muestra

3.3.7.2. Método del secuestro del catión radical ABTS^{•+}

Se siguió el método descrito por Arnao *et al.* (2001), modificado por Thaipong *et al.*⁶¹, que indica lo siguiente:

Se utilizó la muestra disuelta en metanol (1 mg/mL). La solución patrón (SP) estuvo formado por ABTS (7,4 mM) y K₂S₂O₈ (persulfato de potasio) a 2,6 mM. La solución de trabajo (ST) estuvo formado por 1mL de SP ajustándose la absorbancia a $1,1 \pm 0,2$ con metanol de a 734 nm. A 150 μL de la muestra se añadió 2850 μL de ST, Se incubó en oscuridad por 2 horas posteriormente se realizaron lecturas a 517nm. La actividad secuestradora porcentual del ABTS se determinó con la siguiente fórmula:

$$\%AA = \left[\frac{\text{Abs}_{ABTS} - \text{Abs}_{Mp}}{\text{Abs}_{ABTS}} \right] \times 100$$

Donde:

%AA: Porcentaje de actividad secuestradora del ABTS.

Abs_{ABTS} : Absorbancia del ABTS.

Abs_{Mp} : Absorbancia de la muestra.

Asimismo, se preparó una curva estándar con Trolox (25 – 800 μmol), las pruebas fueron realizadas por tres repeticiones y se expresaron en mg μmol ET/g E. (Anexo 11, 23, 24 y 25)

La concentración mínima inhibitoria (IC₅₀) (Anexo 31 y 32), se determinó la concentración mínima necesaria para inhibir el 50% del radical ABTS, por lo que, se preparó 0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL de extracto metanólico y se calculó mediante:

$$\% \text{ inhibición del DPPH} = (\text{Abs}_c - \text{Abs}_{Mp}) / \text{Abs}_c \times 100$$

Abs_c = Absorbancia control

Abs_{Mp} = Absorbancia de muestra

3.3.7.3. Método del potencial antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Se siguió el método elaborado por Benzie y Strain (1996) modificado por Thaipong *et al.*⁶¹, que indica lo siguiente:

Se utilizó la muestra disuelta en metanol (1 mg/mL). La solución patrón (SP) se conformó por tres soluciones el buffer acetato (300 μ M) de pH 3,6 (S_1); TPTZ (10 mM) (S_2) y $FeCl_3$ (20 mM) (S_3). La solución de trabajo (ST) se conformó por 25 mL del S_1 y 2,5 mL S_2 y 2,5 mL de S_3 , atemperado a 37°C. A 150 μ L de muestra se añadió 2850 μ L de ST y se dejó a incubación por 30 minutos, posteriormente se realizó lecturas a 593 nm.

Asimismo, se preparó una curva estándar con Trolox (25 – 800 μ mol), las pruebas fueron realizadas por tres repeticiones y se expresaron en mg μ mol ET/g E. (Anexo 12, 26, 27 y 28).

3.4. Análisis de datos

Los resultados se denotaron como la media aritmética $\pm$ desviación estándar obtenidas por triplicado. El contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante, fueron evaluados mediante el T-student (Anexo 33 y 34), mientras que, la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) fue evaluado con el estadístico ANOVA (Anexo 36), para ver las diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$), todo el procedimiento fue desarrollado con el programa Microsoft Office Excel y SPSS.

IV. RESULTADOS

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao”. Ayacucho, 2023.

Variedad	Muestra (g)	seca	Extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
Criollo	20		0,7644	3,82
Trinitario	20		0,5094	2,55

Tabla 9. Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao”. Ayacucho, 2023.

Metabolitos secundarios	Variedad	
	Criollo	Trinitario
Fenoles	+	+
Flavonoides	+	+
Taninos	+	+
Azúcares reductores	+	+
Aminoácidos	+	+
Alcaloides	+	+
Glucósidos cardiotónicos	+	+
Saponinas	+	+
Lactonas y/ o cumarinas	+	+

Leyenda: ausencia (-), presencia (+).

Tabla 10. Contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao”. Ayacucho, 2023.

Variedad	Fenoles totales (mg GAE/g de muestra)	Flavonoides (mg QE/g de muestra)	Relación flavonoides / fenoles
Criollo	124,90 ± 2,71	58,25 ± 3,89	0,47
Trinitario	104,80 ± 6,25*	51,79 ± 5,54**	0,49

* *T-student* $p < 0,05$ ρ : Fenoles totales

** *T-student* $p > 0,05$ ρ : Flavonoides

Tabla 11. Ensayo de la actividad antioxidante del extracto metanólico de la de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario *Theobroma cacao* L. “cacao”.

Variedad	Actividad antioxidante				
	DPPH		ABTS		FRAP
	μmol ET/g de muestra	%	μmol ET/g de muestra	%	μmol ET/g de muestra
Criollo	235,09 ±	24,45 ±	395,29 ±	73,20 ±	564,37 ±
	2,34*	0,24*	2,44*	0,47*	3,64*
Trinitario	212,15 ±	22,13 ±	345,58 ±	63,79 ±	437,86 ±
	0,93*	0,09*	2,44*	0,47*	5,72*

* *T-student* $p < 0,05$

Tabla 12. Concentración inhibitoria (IC₅₀) del extracto metanólico de la de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao”. Ayacucho, 2024.

Variedad	Actividad antioxidante (IC ₅₀ mg/mL)	
	DPPH*	ABTS**
Criollo	1,36 ± 0,02 ^b	0,47 ± 0,02 ^b
Trinitario	1,68 ± 0,01 ^c	0,55 ± 0,02 ^c
Trolox	0,12 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^a

* ANOVA $\rho = 2,17x10^{-9}$

** ANOVA $\rho = 5,84x10^{-8}$

V. DISCUSIÓN

El *Theobroma cacao* L. “cacao”, es una especie oriunda de las regiones tropicales, es de gran interés industrial y alimentario por los productos derivados de la fermentación de los granos del fruto, su importancia también radica en el contenido de compuestos funcionales, estudio fitoquímico de fenoles, fibra, aditivos y contenido de grasas presentes en las semillas. Por otro lado, la cáscara del fruto que es uno de los subproductos presentes en mayor porcentaje, también supone un interés como fuente renovable de compuestos químicos, así como también farmacológico, puesto que, presenta compuestos fenólicos de interés antioxidante por su capacidad de inhibir la formación de radicales libres, relacionado con el desarrollo de muchas enfermedades crónicas. Por ello, el presente trabajo se basó en cuantificar fenoles totales, flavonoides y su respectiva actividad antioxidante in vitro a partir del extracto metanólico obtenidos a partir de la cáscara del fruto del *Theobroma cacao* L. “cacao” en dos variedades, el criollo y el trinitario procedentes del VRAEM.

En la **tabla 8**, se aprecia el rendimiento obtenido del extracto en la cual la variedad criolla obtuvo un mejor rendimiento del 3,82%, mientras que la variedad trinitaria obtuvo solo un 2,55%, estos resultados podrían deberse a que la cáscara contiene diferentes compuestos funcionales en mayor cantidad, como indica Murillo *et al.*¹⁶, que en su estudio la variedad criolla y CCN-51 presentaron elevados contenidos de fibra cruda (29,78 y 30,69 % para ambas variedades, respectivamente), seguido de componentes como grasas, y carbohidratos; esto podría implicar en el rendimiento obtenido de la extracción, esto implica que mayormente la cáscara de la mazorca está compuesto por fibra vegetal. Por otro lado, el tipo de extracción realizado está relacionado directamente con los compuestos de interés a estudiar, el trabajo de investigación estuvo basado en la extracción metanólica, lo que podríamos inferir que los componentes presentes de la cáscara de *Theobroma cacao* L. “cacao” en su mayoría no fueron solubles en metanol.

En la **tabla 9**, se observa el resultado obtenido por el tamizaje fitoquímico desarrollado por la técnica según Miranda y Cuéllar⁶⁰, donde las dos variedades de *Theobroma cacao* L.. “cacao”, criollo y trinitario reportan presentar metabolitos secundarios como: fenoles, flavonoides, taninos, azúcares reductores, aminoácidos, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, saponinas y lactonas y/o cumarinas (Anexo 13). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportado por Kayaputri *et al.*⁶³ y Yahya *et al.*⁶⁴, quienes en su estudio fitoquímico cualitativo reportan que la cáscara del fruto de *Theobroma cacao* L. “cacao” contienen compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos, taninos y alcaloides. Vargas *et al.*¹⁷, identificó en su investigación al a ácidos fenólicos como el ácido vanílico, 1-O-siringoil-glucopiranososa, 5-O-hexósido del ácido gentísico, ácido protocatequico; entre flavonoides se identificó procianidinas ((-) epicatequina (+), catequina, (+) epicatequina, procianidina de tipo B y C); flavonoles (quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-arabinosa, apigenina-7-O-glucurónido, 8-C-glucosil-6-C-arabinosilapigenina, 6-C-glucosil-8-C-arabinosilapigenina, , 8-C-galactosil-6-C-arabinosilapigenina, kaempferol 3-glucurónido, kaempferol 3-O-pentósido; entre alcaloides (cafeína y teobromina); Mashuni *et al.*⁶⁵, identificó cumarinas (4,5,7-trimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-1-benzopyran-2-one, 4,5,7-trimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2H-1-benzopyran-2-one, 7-Hydroxy-3-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-coumarin.

En la **tabla 10**, se muestra el contenido de fenoles y flavonoides, en la cual, la variedad criolla del *Theobroma cacao* L. , presentó un mayor contenido ($124,90 \pm 2,71$ GAE/g E. y $58,25 \pm 3,89$ QE/g E., respectivamente), siendo superior a la variedad trinitaria del *Theobroma cacao* L. “cacao”, siendo $104,80 \pm 6,25$ GAE/g de muestra y $51,79 \pm 5,54$ QE/g de muestra, para fenoles y flavonoides, respectivamente. Respecto a la relación de flavonoides y fenoles, la variedad trinitaria reporto contener mayor fracción de flavonoides con respecto a los fenoles. Las diferencias en el contenido de fenoles totales, fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), mientras que, respecto al contenido de flavonoides, no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$), ambos evidenciados con el test de Student (Anexo 34). Existen reportes para fenoles totales, como Murillo *et al.*¹⁶, también reporta que la variedad criolla presenta alto contenido de fenoles ($69,53 \pm 1,23$ mg GAE/g); Martínez *et al.*², reportan que la variedad trinitaria de su estudio resulto contener fenoles de 206,67 y 365,33 mg GAE/100 g, no obstante, nuestro resultado fue superior. En la variedad trinitaria del *Theobroma cacao* L. “cacao de tipo TSH 565, Sotelo *et al.*²¹, reporta que contiene de 16,40 a 23,01 EAG/g, como también Murcia y Castañeda³⁰, en la variedad trinitaria de tipo TSH 565 mostraron un

contenido de fenoles de 43,20 a 129,91 mg GAE/g de muestra, ambos resultados son muy similares a los obtenidos en nuestro estudio, por otro lado, Ordoñez *et al.*²⁹; reporta que una variedad de cacao proveniente de Huánuco contiene $1,78 \pm 0,13$ g EAG/100g de muestra. Con respecto a otras variedades del *Theobroma cacao* L. “cacao”, Vargas *et al.*¹⁷, reportó que la variedad CCN-51 contiene 111,05 mg GAE/g de muestra, siendo inferior a lo reportado en nuestro estudio. Estas diferencias entre los hallazgos en la presente investigación y los reportes de otros autores, podría deberse a factores tales como, procedencia de la variedad puesto que cada variedad tiene una procedencia geográfica diferente, la variación genética entre cada variedad está bien marcada puesto que muchas variedades son clones y su contenido polifenólicos podría verse afectado, las estaciones de recolección del fruto, el tipo de extracción realizado⁶⁶, tal como reporta Rachmawaty *et al.*⁶, que en su investigación que en la extracción con acetona tuvo mayor contenido de fenoles (94,92 mg GAE/g extracto), en comparación con la etanólica (49,92 GAE/g extracto) de una variedad de *Theobroma cacao* L. “cacao” no especificada, así mismo, Indrianingsih *et al.*³, también utilizó fraccionamiento con diferentes solventes en la variedad amarilla y morada de la cáscara de *Theobroma cacao* L. “cacao”, donde también obtuvo que la fracción metanólica para ambas variedades obtuvo un mejor resultado para su contenido de fenoles totales. Por otro lado, a pesar del uso adecuado del solvente para extraer, reportes indican que realizar un desengrasado de la muestra de cacao resulta extraer un mayor contenido de fenoles totales, tal como reporta Laila *et al.*⁶⁷, que su estudio aprovechó el desengrasamiento mecánico lo que implicó que sus mejores resultados del contenido de fenoles, no obstante, para una mejor optimización de la extracción investigaciones sugieren realizar un desengrase previo con solventes de baja polaridad como el éter de petróleo para extraer compuestos solubles como ácidos grasos, triterpenos, ésteres y alcoholes aromáticos⁶⁸, es por ello que en la investigación desarrollada por Yahya *et al.*⁶⁴, desarrolla fraccionamiento con solventes de diferente polaridad al extracto acuoso de cáscara del cacao, seguido del partición con n-hexano, acetato de etilo y finalmente metanol, obteniendo que la fracción acetato de etilo reportó un contenido de 570,44 mg GAE/g de muestra, resultando superior a lo obtenido en nuestro estudio, lo que corrobora la importancia del uso del solvente adecuado y el respectivo fraccionamiento con solventes de polaridad variada. En relación con otras partes del fruto de cacao, Enciso *et al.*⁷, reportan que la semilla de la variedad criollo tuvo un mayor contenido de fenoles totales (80,43 mg EAG/g) en semillas con respecto a otras variedades, sin embargo, en nuestro estudio se podría concluir que la cáscara posee un mejor contenido

de fenoles totales y flavonoides de gran interés, puesto que trabajos anteriores han determinado que en la cáscara del *Theobroma cacao* L. “cacao”, contiene metabolitos secundarios como las metilxantinas, flavonoides, procianidinas, entre las cuales resaltan ácidos fenólicos derivados del ácido vanílico, ácido protocatequico, ácido gálico, ácido cumárico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico, derivados del ácido gentísico¹⁷⁻²⁰; entre las metilxantinas se han identificados a la teobromina, cafeína¹⁷; así mismo, se identificaron entre los flavonoides a derivados de la epicatequina, procianidina, derivados glicósidos de apigenina, kaempferol, quercetina, ramnetina, linarina, sineginhomoorientina¹⁷⁻¹⁹, todos los compuestos identificados son de gran relevancia.

En la **tabla 11**, se contienen la actividad antioxidante obtenido por el extracto metanólico de la cáscara del fruto de *Theobroma cacao* L., donde la variedad criolla muestra superioridad frente a la variedad trinitaria, reportándose $235,09 \pm 2,34$; $395,29 \pm 2,44$ y $564,37 \pm 3,64$ $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente; mientras que, la variedad trinitaria contiene $212,15 \pm 0,93$, $345,58 \pm 2,44$ y $437,86 \pm 5,72$ $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$), evaluadas con el estadístico t -Student (Anexo 35). Martínez *et al.*², reportan que la actividad antioxidante de la variedad criolla se encuentra entre 1,57 a 33,93; 2,48 a 22,93 y 0,67 a 4,69 $\mu\text{mol ET/g}$ para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente; lo que nos indica que los resultados obtenidos son superiores, esto se debe específicamente al tipo de extracción realizado puesto que se desarrolló un extracción acuosa sin uso de solventes convencionales y nuestro estudio fue realizado mediante una extracción metanólica, múltiples estudios indican que el uso del solvente está relacionado con los compuestos de interés a extraer, lo que implicaría que dependerá de la naturaleza polar de los compuestos y el solvente para conseguir una mejor extracción, los compuestos fenólicos en su gran mayoría poseen una alta polaridad lo que implicaría que tendrán mejor afinidad y solubilidad en compuestos altamente polares⁶⁹, así mismo, los polifenoles presentaron una solubilidad alta al solvente de menor polaridad en comparación con el agua⁷⁰, es por ello que, entre los solventes polares convencionales los polifenoles como agliconas, asociados glucósidos y oligómeros suelen extraerse con mayor facilidad con solventes como metanol, etanol, acetonitrilo y acetona o mediante disoluciones con agua, puesto que brinda características al medio para una mejor solubilidad.⁷¹

Entre otras variedades del *Theobroma cacao* L. “cacao”, Sotelo *et al.*²¹, reporta que la variedad TSH 565 reporta presentar una actividad antioxidante de 13660,13 a 16904,25

y de 11603,12 a 22961,57 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$, para ensayos de FRAP y ABTS, respectivamente. En la variedad CCN-51 Vargas *et al.*¹⁷, reporta poseer una actividad antioxidante de $87,42 \pm 1,22$; $155,38 \pm 2,96$ y $127,44 \pm 3,86$ $\mu\text{mol ET/g}$, para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente.

La actividad antioxidante que presenta la variedad criolla y trinitaria del *T. cacao* L. “cacao”, en esencia debe a la presencia de compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos y flavonoides, que son compuestos ampliamente estudiados por lo que son responsables de la actividad antioxidante⁷², en la cáscara de *Theobroma cacao* L. “cacao” se han identificado ácidos fenólicos y flavonoides que según el trabajo de Yahya *et al.*⁶⁴, se reporta un alto contenido de fenoles totales de 570,44 mg GAE/g de muestra, donde solo se ha cuantificado 4,34 mg QE/g de extracto, esto podría inferir que existen un mayor contenido de ácidos fenólicos, esta mención corrobora el estudio realizado por Rebollo *et al.*⁷³, quién identificó trece ácidos fenólicos (siete tipos compuestos derivados del ácido hidroxibenzoico, tres derivados del ácido hidroxicinámico, al ácido mandélico, dos derivados ácidos fenilacéticos), y solo siete flavonoides (dos flava-3-oles monómeros, tres flava-3-oles dímeros y 2 flavonoles), esto aseveraciones implicarían los ácidos fenólicos son los responsables de la actividad antioxidante.

Existen diversas técnicas analíticas que nos permitan evaluar el comportamiento antioxidante de determinados compuestos químicos, ya sea de manera *in vitro* o *in vivo*, los ensayos antioxidantes *in vitro* nos brindan una aproximación de lo que podría ocurrir en situaciones más complejas (*in vivo*), entre los principales métodos tenemos a DPPH, ABTS y FRAP; técnicas prácticas que nos ayudan a estimar la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos que están presentes en diversas partes de las especies vegetales (frutos, hojas, tallos, etc.), quienes son los responsables de mitigar los efectos negativos de los procesos generados por los radicales libre que implican a las especies reactivas del oxígeno (EROS), mediante su captación o secuestro^{21,74}, el estudio fue desarrollado mediante el ensayo de DPPH, ABTS y FRAP. La diferenciación entre los resultados entre cada ensayo realizado se debe al fundamento de reacción que se desarrolla en cada técnica, el DPPH que se desarrolla en un medio orgánico lo que implica que reaccione con compuestos con características antioxidantes de polaridad baja o media, es decir, que componentes hidrofóbicos presentan reactividad con el radical DPPH, en cambio para el ensayo del radical ABTS que se desarrolla en medio acuoso, el radical tiene una selectividad para reaccionar con compuestos hidrofílicos y lipofílicos, es decir que es posible que el extracto tienen más componentes antioxidantes de característica lipofílicos puesto que se reporta un mejor resultado para el ensayo de

ABTS en comparación con el DPPH⁶⁹, algunos ácidos fenólicos y flavonoides simples presentaron una polaridad media (característica lipofílica) como también los carotenoides que pueden reaccionar con el radical ABTS, componentes que estudios previos presentaron una actividad antioxidante⁷⁵, esto concuerda con la tabla 8 donde más del 50% son compuestos fenólicos diferentes a los flavonoides que podría tratarse de ácidos fenólicos; a su vez en el ensayo de FRAP se desarrolla en medio acuoso, lo que implica reactividad compuestos hidrofílicos; se podría concluir que en la cáscara del *Theobroma cacao* L. “cacao”, estaría compuesto en mayoría por compuestos fenólicos hidrofílicos y flavonoides simples, datos concordantes con el reporte de Vargas *et al.*¹⁷, Valadez *et al.*¹⁸ y Abdul *et al.*¹⁹, quienes reportan compuestos fenólicos con las características mencionadas.

En la **tabla 12**, se reporta el resultado de la concentración inhibitoria (IC₅₀) con respecto a los ensayos de DPPH y ABTS, donde se reporta que la variedad criolla tuvo un mejor IC₅₀ de 1,36 mg/mL con respecto a la variedad trinitaria (IC₅₀: 1,68 mg/mL), sin embargo, no fue superior al resultado de trolox (0,12 mg/mL), por otro lado, para el ensayo de ABTS la variedad criolla tuvo un mejor IC₅₀ de 0,47 mg/mL con respecto a la variedad trinitaria (IC₅₀: 0,55 mg/mL), sin embargo, no fue superior al resultado de trolox (0,06 mg/mL) (Anexo 30, 31, 32 y 33). Estadísticamente se obtuvo que los resultados obtenidos son diferentes y a su vez cada IC₅₀ de cada variedad y el trolox por método son independientes, es decir, no presentaron similitudes en el IC₅₀ reportado (Anexo 36 y 37), por tanto, se puede afirmar, que los extractos metanólicos de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario, tienen un comportamiento bioquímico diferente.

Murillo *et al.*¹⁶, también observan que la variedad criolla presenta un IC₅₀ de 0,06 mg/mL mediante el ensayo de DPPH, este resultado en comparación con el nuestro es superior, esto puede deberse quizá a la procedencia de la muestra. En la variedad trinitaria del *Theobroma cacao* L. “cacao de tipo TSH 565, donde a partir de las muestras tratadas muestra un IC₅₀ de 6,34 a 12,54 mg/mL para el método de DPPH, donde la variedad trinitaria fue superior. En otras variedades del cacao Ordoñez *et al.*²⁹; reporta que la cáscara del cacao de variedad no especificada posee tener un 15,24 y 9,21 mg/mL, para ensayos de DPPH y ABTS, respectivamente, también Mora y Pintado⁷⁶, reportan un IC₅₀ de 23.68 mg/mL en el ensayo de DPPH para una variedad no especificada, siendo inferior a lo obtenido en nuestro trabajo, siendo en ambos casos, inferior a lo obtenido en el presente trabajo. El IC₅₀ es la concentración de una sustancia o compuesto que se requiere para eliminar, neutralizar o secuestrar el 50% de los radicales libres, mientras el valor de IC₅₀ sea más bajo, entonces, más potente será la capacidad de la

sustancia para eliminar los radicales libre, lo que implicaría presentar mayor actividad antioxidante⁷⁷, en los resultados la variedad criolla del *Theobroma cacao* L. “cacao”, presenta un menor resultado de IC₅₀ de 1,37 mg/mL (DPPH) y 0,47 mg/mL (ABTS), en comparación con reportado por la variedad trinitaria se obtuvo un IC₅₀ de 1,68 mg/mL (DPPH) y 0,55 mg/mL (ABTS), por lo tanto, se puede inferir que la variedad criolla del *Theobroma cacao* L. “cacao” posee una mejor actividad antioxidante, el cual es corroborado por su mayor contenido de fenoles totales y flavonoides (**tabla 8**) que la variedad trinitario, el cual, implica que la relación del contenido de fenoles totales es directamente proporcional respecto a la actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos presentaron características que les atribuye la capacidad antioxidante; donde no solo es por presentar grupos hidroxilo, además es la presencia de grupos portadores de oxígeno como grupo metoxi, el peso molecular, oligosacáridos; estos factores también influyen en las propiedades antioxidantes.⁷⁸ Las bondades de estos compuestos radica en sus propiedades como agentes anticancerígenos son su alta accesibilidad con baja toxicidad, especificidad de respuesta y diversos efectos biológicos⁷¹, a su vez indispensable contra los efectos negativos que ocasionan los radicales libres en el organismo como la enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, se necesita más investigación sobre estos químicos, precisar su mecanismo de acción específico y sus efectos biológicos, puesto que existe una alta diversidad estructural inherente de los ácidos fenólicos y flavonoides, por ello su impacto en el ser humano es diferente.

En consecuencia, los compuestos fenólicos presentes en la cáscara del *Theobroma cacao* L. “cacao” de las variedades criollo y trinitario, presentan un potencial antioxidante demostrado en la presente investigación; por tanto, poder identificar los componentes individuales responsables de la propiedad antioxidante genera un gran interés. Asimismo, se crean las condiciones para agregarle valor al uso de la cáscara del fruto del cacao, el cual, actualmente se desecha, como una fuente potencial de antioxidantes que pueden ser utilizados en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao” del VRAEM presentaron actividad antioxidante mediante los métodos de DPPH, ABTS y FRAP; siendo la variedad criolla quien presentó mayor actividad antioxidante frente a la variedad trinitaria del *Theobroma cacao* L. “cacao”.
2. El extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de *Theobroma cacao* L. “cacao” presentaron fenoles, flavonoides, taninos, azúcares reductores, aminoácidos, alcaloides, glucósidos cardiotónicos, saponinas y lactonas y/o cumarinas.
3. La variedad criolla del *Theobroma cacao* L. “cacao”, presentó mayor contenido de fenoles totales y flavonoides ($124,90 \pm 2,71$ mg GAE/g de E y $58,25 \pm 3,89$ mg QE/g de E), que la variedad trinitaria ($104,80 \pm 6,25$ mg GAE/g de E y $51,79 \pm 5,54$ mg QE/g de E.). Se hallaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales ($p < 0,05$), mientras que, no hubo diferencias en el contenido de flavonoides ($p > 0,05$).
4. La variedad criolla del *Theobroma cacao* L. “cacao” presentó una mayor actividad antioxidante ($235,09 \pm 2,34$; $395,29 \pm 2,44$ y $564,37 \pm 3,64$ $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra), que la variedad trinitaria ($212,15 \pm 0,93$; $345,58 \pm 2,44$ y $437,86 \pm 5,72$ $\mu\text{mol ET/g}$ de muestra), para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente) ($p < 0,05$). Así mismo el IC_{50} de la variedad criolla (1,36 y 0,47 mg/mL) fue superior a la variedad trinitaria (1,68 y 0,55 mg /mL), para los ensayos de DPPH y ABTS, respectivamente ($p < 0,05$).

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de las diferentes variedades de *Theobroma cacao* “cacao” para contemplar la diferenciación del contenido de fenoles totales y su respectiva actividad antioxidante.
2. Realizar el estudio por UHPLC-MS para identificar estructuralmente los componentes fenólicos presentes en la cáscara de la fruta del *Theobroma cacao* “cacao” responsables de la actividad antioxidante obtenido en nuestro estudio.
3. Desarrollar estudios con otras metodologías para corroborar la actividad antioxidante que se obtuvo en nuestro estudio, así como el uso de solventes de diferente polaridad, ensayos *in vitro* como el ORAC, estudios *in vivo* para determinar el potencial antioxidante.
4. Desarrollar estudios que tengan como objetivos la formulación de formas farmacéuticas a partir de los extractos obtenidos mediante técnicas de aislamiento y purificación de compuestos fenólicos aprovechando sus propiedades farmacológicas.
5. Se recomienda el uso de solventes (metanol) con bajo impacto ambiental, con la cual contribuimos con técnicas de extracción eco amigables o ambientalmente amigables.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry [Internet]. 15 de enero de 2015 [citado 11 de marzo de 2024];30(1):11-26. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
2. Martínez R, Torres P, Meneses MA, Figueroa JG, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. Food Research International [Internet]. noviembre de 2012 [citado 23 de marzo de 2023];49(1):39-45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996912003146?via%3Dihub>
3. Indrianingsih A, Wulanjati M, Windarsih A, Bhattacharjya D, Suzuki T, Katayama T. *In vitro* studies of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of *Theobroma cacao*, *Annona muricata* and *Clitoria ternatea*. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. mayo de 2021 [citado 10 de abril de 2023];33:101995. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101995>
4. Ginting B, Maulana I, Saidi N, Astryana SY. Isolation and activity antioxidant test of cocoa pod husk ethyl asetat extracts (*Theobroma cacao* L.). Jurnal Natural [Internet]. 30 de junio de 2019 [citado 31 de agosto de 2023];19(2):49-53. Disponible en: <https://doi.org/10.24815/jn.v19i2.12568>
5. Indrianingsih AW, Wulanjati MP, Windarsih A, Bhattacharjya DK, Suzuki T, Katayama T. *In vitro* studies of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of *Theobroma cacao*, *Annona muricata* and *Clitoria ternatea*. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. mayo de 2021 [citado 29 de agosto de 2023];33:101995. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101995>
6. Rachmawaty, Mu'Nisa A, Hasri, Pagarra H, Hartati, Maulana Z. Active Compounds Extraction of Cocoa Pod Husk (*Thebroma Cacao* I.) and Potential as Fungicides. J Phys Conf Ser [Internet]. 1 de junio de 2018 [citado 23 de marzo de 2023];1028(1):012013. Disponible en: [10.1088/1742-6596/1028/1/012013](https://doi.org/10.1088/1742-6596/1028/1/012013)
7. Enciso E, Aguilar E, Común P. Actividad antioxidante y efecto genotóxico de las semillas de *Theobroma cacao* L. "cacao". Ayacucho - 2018. Investigación [Internet]. 1 de julio de 2019 [citado 31 de julio de 2023];27(2):159 – 167-159 – 167. Disponible en: <http://revistas.unsch.edu.pe/index.php/investigacion/article/view/133>
8. Ramírez González MB, Víctor ;, Cely Niño H, Sandra ;, Ramírez I. Antioxidant activity of clones of cocoa (*Theobroma cacao* I.) fine and aromatic grown in the state of Chiapas-México. Perspectivas en Nutrición Humana [Internet]. 2013 [citado 4 de septiembre de 2023];15(1):27-40. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-41082013000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
9. Borja Fajardo JG, Horta Tellez HB, Peñaloza Atuesta GC, Sandoval Aldana AP, Mendez Arteaga JJ. Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima,

Colombia. Heliyon [Internet]. mayo de 2022 [citado 4 de septiembre de 2023];8(5):e09402. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09402>

10. Waizel-Haiat S, Waizel-Bucay J, Magaña-Serrano J, Campos-Bedoya P, San Esteban-Sosa J. Cacao y chocolate: seducción y terapéutica. Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC [Internet]. 2012 [citado 28 de marzo de 2023];57(3):236-45. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/abc/bc-2012/bc123k.pdf>

11. Jardín Botánico de Missouri. Tropicos | Name - *Theobroma cacao* [Internet]. 2023 [citado 19 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://tropicos.org/name/30400642>

12. Mozariegos Y. El cultivo del cacao (*Theobroma Cacao* L.) en el Sureste de México. [Internet]. [Buenavista Saltillo]: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2015 [citado 24 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/4620>

13. Martínez J, Novoa R, Martínez D, Espinosa M, Martínez A, Grandett L, et al. Modelo productivo para el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el departamento de Sucre [Internet]. Editorial AGROSAVIA. Mosquera: Editorial AGROSAVIA; 2022 [citado 24 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/book/270>

14. Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre MI, Weigend M. Factsheet: Datos botánicos de cacao [Internet]. Piura; 2011 [citado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.promperu.gob.pe/handle/20.500.14152/1051>

15. Álvares K, Quilimba F. Aprovechamiento de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la elaboración de polvo y sus usos culinarios. [Internet] [Tesis pregrado]. [Guayaquil]: Universidad de Guayaquil; 2018 [citado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/35658>

16. Murillo-Baca S, Ponce-Rosas F, Huamán-Murillo M. Características fisicoquímicas, compuestos bioactivos y contenido de minerales en la harina de cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.). Manglar: Revista de Investigación Científica, ISSN-e 2414-1046, ISSN 1816-7667, Vol 17, N° 1, 2020 (Ejemplar dedicado a: Enero-Marzo), págs 67-73 [Internet]. 2020 [citado 16 de marzo de 2023];17(1):67-73. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8104279>

17. Vargas-Arana G, Merino-Zegarra C, Tang M, Pertino MW, Simirgiotis MJ. UHPLC-MS Characterization, and Antioxidant and Nutritional Analysis of Cocoa Waste Flours from the Peruvian Amazon. Antioxidants 2022, Vol 11, Page 595 [Internet]. 21 de marzo de 2022 [citado 23 de marzo de 2023];11(3):595. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3921/11/3/595>

18. Valadez-Carmona L, Plazola-Jacinto CP, Hernández-Ortega M, Hernández-Navarro MD, Villarreal F, Necoechea-Mondragón H, et al. Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). Innovative Food Science & Emerging Technologies [Internet]. junio de

2017 [citado 28 de agosto de 2023];41:378-86. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012>

19. Abdul Karim A, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Abd Gani SS, Zainudin BH, et al. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. BMC Complement Altern Med [Internet]. 7 de diciembre de 2014 [citado 28 de agosto de 2023];14(1):381. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-381>

20. Grillo G, Boffa L, Binello A, Mantegna S, Cravotto G, Chemat F, et al. Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. Food Research International [Internet]. enero de 2019 [citado 28 de agosto de 2023];115:200-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.057>

21. Sotelo L, Alvis A, Arrázola G. Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas [Internet]. 12 de agosto de 2015 [citado 23 de marzo de 2023];9(1):124. Disponible en: <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751>

22. Oyeleke SA, Ajayi AM, Umukoro S, Aderibigbe AO, Ademowo OG. Anti-inflammatory activity of *Theobroma cacao* L. stem bark ethanol extract and its fractions in experimental models. J Ethnopharmacol [Internet]. agosto de 2018 [citado 10 de abril de 2023];222:239-48. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.050>

23. Osukoya O, Fadaka A, Adewale O, Oluloye O, Ojo O, Ajiboye B, et al. *In vitro* anthelmintic and antioxidant activities of the leaf extracts of *Theobroma cacao* L. AIMS Agriculture and Food [Internet]. 2019 [citado 29 de agosto de 2023];4(3):568-77. Disponible en: <https://doi.org/10.3934/agrfood.2019.3.568>

24. Komlaga G, Forkuo AD, Suleman N, Nkrumah D, Nketia R, Bekoe SO. Antimalarial Property and Acute Toxicity of the Leaves of *Theobroma cacao* L. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine [Internet]. 13 de julio de 2021 [citado 29 de agosto de 2023];2021:1-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2021/2852442>

25. Sarmadi B, Ismail A, Hamid M. Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. Food Research International [Internet]. enero de 2011 [citado 10 de abril de 2023];44(1):290-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.017>

26. Ioannone F, Di Mattia CD, De Gregorio M, Sergi M, Serafini M, Sacchetti G. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. Food Chem [Internet]. mayo de 2015 [citado 10 de abril de 2023];174:256-62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.019>

27. Hatano T, Miyatake H, Natsume M, Osakabe N, Takizawa T, Ito H, et al. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. Phytochemistry [Internet]. abril de 2002 [citado 10 de abril de 2023];57(4):501-12. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00111-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00111-1)

2023];59(7):749-58. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00051-1)

28. Patil PP, Khanal P, Patil VS, Charla R, Harish DR, Patil BM, et al. Effect of *Theobroma cacao* L. on the Efficacy and Toxicity of Doxorubicin in Mice Bearing Ehrlich Ascites Carcinoma. *Antioxidants* [Internet]. 31 de mayo de 2022 [citado 29 de agosto de 2023];11(6):1094. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/antiox11061094>

29. Ordoñez E, 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*). *Scientia Agropecuaria* [Internet]. 28 de junio de 2019 [citado 28 de marzo de 2023];10(2):175-83. Disponible en: <https://acortar.link/Q8wASh>

30. Murcia Artunduaga KS, Castañeda M del R. Evaluación del contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos etanólicos de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* [Internet]. 17 de junio de 2022 [citado 28 de marzo de 2023];13(2):53-66. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8479096>

31. Santos RX, Oliveira DA, Sodré GA, Gosmann G, Brendel M, Pungartnik C. Antimicrobial activity of fermented *Theobroma cacao* pod husk extract. *Genetics and Molecular Research* [Internet]. 2014 [citado 29 de agosto de 2023];13(3):7725-35. Disponible en: <https://doi.org/10.4238/2014.september.26.10>

32. Siedentopp U. El cacao, planta medicinal y de deleite. *Revista Internacional de Acupuntura* [Internet]. 1 de octubre de 2009 [citado 28 de marzo de 2023];3(4):197-200. Disponible en: <https://acortar.link/pmMeSc>

33. Bello N. Respuesta de cinco genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) a cuatro dosis de cadmio bajo condiciones de viveros en Chanchamayo. [Internet] [Tesis de pregrado]. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2020 [citado 20 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4566>

34. Ministerio de Agricultura y Riego - MIDAGRI. Estudio del Cacao en el Perú y en el Mundo, Un Análisis de la Producción y el Comercio. Ministerio de Agricultura y Riego [Internet]. 2016 [citado 3 de abril de 2023]; Disponible en: <http://repositorio.midagri.gob.pe:80/jspui/handle/20.500.13036/71>

35. Ramos A, G mez M. Caracterización fenotípica y genotípica de aislados de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Dibulla, Guajira. [Internet] [Tesis de maestría]. [Barranquilla]: Universidad Libre Seccional Barranquilla; 2019 [citado 20 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10901/17815>

36. Gamboa R. «Comportamiento en vivero de cuatro clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre diferentes patrones en Satipo» [Internet] [Tesis de pregrado]. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2015 [citado 20 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12996/949>

37. Alarcon A. Caracterización morfológica de selecciones élite, locales e introducidas de cacao (*Theobroma cacao* L.) Valle del Río Apurimac y Ene - VRAE [Tesis de pregrado]. [Ayacucho]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2009.
38. Bioersity Internacional. Catálogo de cacaos del Perú [Internet]. Lima; 2022 [citado 20 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://cacaodiversity.org/wp-content/uploads/2023/02/Libro-de-Cacao-Peru-elegidos2.pdf>
39. García L. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú. Lima; 2007.
40. Castro M. Polifenoles: Compuestos bioactivos con efectos benéficos en la prevención de diabetes tipo 2. REDCieN [Internet]. 2019 [citado 28 de marzo de 2023];1(3):6-6. Disponible en: <https://redcien.com/index.php/redcien/article/view/5>
41. Mamari H. Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. 19 de julio de 2021 [citado 18 de marzo de 2024]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/77604>
42. Rentzsch M, Wilkens A, Winterhalter P. Non-flavonoid Phenolic Compounds. En: Wine Chemistry and Biochemistry [Internet]. New York, NY: Springer New York; [citado 25 de diciembre de 2023]. p. 509-27. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_23
43. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. J Agric Food Chem [Internet]. 1 de marzo de 2005 [citado 26 de octubre de 2023];53(6):1841-56. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
44. Díez L, Olives A. Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en Olivas [Internet] [Tesis de pregrado]. [Madrid - España]: Universidad Complutense de Madrid; 2018 [citado 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14352/15331>
45. López T. Flavonoides. Offarm [Internet]. 1 de abril de 2002 [citado 6 de diciembre de 2022];21(4):108-13. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-flavonoides-13028951>
46. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 29 de diciembre de 2016;5:e47.
47. Ulubelen A, Topcu G, Kolak U. Labiatae Flavonoids and their Bioactivity. En 2005 [citado 11 de marzo de 2024]. p. 233-302. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80035-3](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80035-3)
48. Mariaca C, Zapata M, Uribe P. Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología [Internet]. 2016 [citado 7 de diciembre de 2022];24(3):162-73. Disponible en: <https://doi.org/10.29176/2590843X.292>
49. Lorencini M, Brohem CA, Dieamant GC, Zanchin NIT, Maibach HI. Active ingredients against human epidermal aging. Ageing Res Rev [Internet]. mayo de

2014 [citado 29 de marzo de 2023];15:100-15. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163714000397?via%3Dihub>

50. Tokyo Chemical Industry. Trolox, un antioxidante estándar utilizado para ensayos de capacidad antioxidante | Industria química de Tokio Co., Ltd. (APAC) [Internet]. [citado 11 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.tcichemicals.com/ID/en/product/tci-topics/ProductHighlights_20141110

51. Estévez M, Kylli P, Puolanne E, Kivikari R, Heinonen M. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. Meat Sci [Internet]. diciembre de 2008 [citado 18 de marzo de 2024];80(4):1290-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.004>

52. Huet C, Martín M. Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras [Internet] [Tesis de pregrado]. [Madrid]: Universidad Complutense; 2017 [citado 7 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://n9.cl/0f4om>

53. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chem [Internet]. febrero de 2012 [citado 26 de octubre de 2023];130(4):1036-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>

54. Alam MdN, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal [Internet]. abril de 2013 [citado 26 de octubre de 2023];21(2):143-52. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>

55. Cano A, Maestre AB, Hernández-Ruiz J, Arnao MB. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. Processes [Internet]. 6 de enero de 2023 [citado 18 de marzo de 2024];11(1):185. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pr11010185>

56. Zulueta A, Esteve M, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem [Internet]. 1 de mayo de 2009 [citado 19 de enero de 2023];114(1):310-6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>

57. Panak Balentić J, Ačkar Đ, Jokić S, Jozinović A, Babić J, Miličević B, et al. Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. Molecules [Internet]. 9 de junio de 2018 [citado 1 de marzo de 2024];23(6):1404. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules23061404>

58. Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. Trends Food Sci Technol. noviembre de 2018;81:172-84.

59. Aguilar-Felices EJ, Romero-Viacava M, Enciso-Roca E, Herrera-Calderon O, Común-Ventura P, Yuli-Posadas R, et al. Antioxidant Activity of the

Germinated Seed of Four Varieties of *Amaranthus Caudatus* L. from Peru. Pharmacognosy Journal. 10 de mayo de 2019;11(3):588-93.

60. Miranda M, Cuéllar A. Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales [Internet]. 1.^a ed. Universidad de la Habana Cuba. Habana - Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000 [citado 7 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://isbn.cloud/9789590717956/manual-de-practicas-de-laboratorio-farmacognosia-y-productos-naturales/>

61. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis [Internet]. 1 de septiembre de 2006 [citado 7 de diciembre de 2022];19(6-7):669-75. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

62. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 1 de marzo de 1999;64(4):555-9.

63. Kayaputri IL, Djali M, Sukri N, Fazaryasti RH. The antimicrobial effectiveness of cacao shell and cacao husk combination on inhibition of pathogenic bacteria in food products. IOP Conf Ser Earth Environ Sci [Internet]. 1 de febrero de 2020 [citado 7 de diciembre de 2023];443(1):012077. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/443/1/012077>

64. Yahya M, Ginting B, Saidi N. *In-Vitro* Screenings for Biological and Antioxidant Activities of Water Extract from *Theobroma cacao* L. Pod Husk: Potential Utilization in Foods. Molecules [Internet]. 16 de noviembre de 2021 [citado 7 de diciembre de 2023];26(22):6915. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules26226915>

65. Mashuni, Hamid FH, Muzuni, Kadidae LO, Jahiding M, Ahmad LO, et al. The determination of total phenolic content of cocoa pod husk based on microwave-assisted extraction method. En 2020. p. 030013.

66. Aryal S, Baniya MK, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R, Koirala N. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. Plants [Internet]. 11 de abril de 2019 [citado 3 de septiembre de 2023];8(4):96. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/plants8040096>

67. Laila U, Nurhayati R, Khasanah Y, Herawati ERN, Wiyono T. Preliminary study of cocoa powder's polyphenol extraction by food grade solvent. IOP Conf Ser Earth Environ Sci [Internet]. 1 de marzo de 2020 [citado 6 de diciembre de 2023];462(1):012037. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/462/1/012037/meta>

68. Faizi S, Sumbul S, Versiani MA, Saleem R, Sana A, Siddiqui H. GC/GCMS analysis of the petroleum ether and dichloromethane extracts of *Moringa oleifera* roots. Asian Pac J Trop Biomed [Internet]. 2014 [citado 3 de septiembre de 2023];4(8):650. Disponible en: <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B141>

69. García A, Aguilar E. Capacidad antioxidante de extractos de hojas de *Senecio nutans* Sch. Bip. «wiska taya». Ayacucho, 2021. [Internet] [Tesis pregrado]. [Huamanga]: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2023 [citado 9 de junio de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/5158>
70. Haminiuk CWI, Plata-Oviedo MSV, de Mattos G, Carpes ST, Branco IG. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. J Food Sci Technol [Internet]. 24 de octubre de 2014 [citado 4 de diciembre de 2023];51(10):2862-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0759-z>
71. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. Molecules [Internet]. 11 de julio de 2016 [citado 3 de diciembre de 2023];21(7):901. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
72. Sun W, Shahrajabian MH. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. Molecules. 15 de febrero de 2023;28(4):1845.
73. Rebollo-Hernanz M, Cañas S, Taladrid D, Segovia Á, Bartolomé B, Aguilera Y, et al. Extraction of phenolic compounds from cocoa shell: Modeling using response surface methodology and artificial neural networks. Sep Purif Technol [Internet]. septiembre de 2021 [citado 7 de diciembre de 2023];270:118779. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118779>
74. Kuskoski EM, Asuero A, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology [Internet]. diciembre de 2005 [citado 7 de diciembre de 2022];25(4):726-32. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/cta/a/B58T9S5zLLxjBL5PVzZXHCF/?lang=es>
75. Rajauria G. *In-Vitro* Antioxidant Properties of Lipophilic Antioxidant Compounds from 3 Brown Seaweed. Antioxidants [Internet]. 28 de noviembre de 2019 [citado 4 de diciembre de 2023];8(12):596. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/antiox8120596>
76. Mora H, Pintado M. Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de la mazorca del cacao fino de aroma (*Theobroma cacao*) [Internet] [Tesis de pregrado]. [Guayaquil]: Universidad de Guayaquil; 2023 [citado 4 de diciembre de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/61542>
77. Olugbami JO, Gbadegesin MA, Odunola OA. *In vitro* evaluation of the antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of the stem bark ethanol extract of *Anogeissus leiocarpus*. Afr J Med Med Sci [Internet]. septiembre de 2014 [citado 6 de diciembre de 2023];43(Suppl 1):101. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679201/>
78. Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins.

Int J Biol Macromol [Internet]. abril de 2023 [citado 1 de marzo de 2024];233:123470. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>

79. Mamta P, Misra K, Dhillon GS, Brar SK, Verma M. Antioxidants. En: Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2014 [citado 8 de marzo de 2023]. p. 117-38. Disponible en: <https://n9.cl/v37j7>

80. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: What they do and how they work. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. enero de 1995 [citado 8 de marzo de 2023];35(1-2):7-20. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399509527682>

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de la clasificación taxonómica.

CONSTANCIA

**LA BIOLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN
TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:**

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Frine Mery, ZAMORA
CONDORI, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de
tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de
Clasificación de Cronquist. A. 1988, siendo su taxonomía la siguiente:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	DILLENIIDAE
ORDEN	:	MALVALES
FAMILIA	:	STERCULIACEAE
GENERO	:	Theobroma
ESPECIE	:	<i>Theobroma cacao</i> L.
N. V.	:	"cacao"

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los
fines que estime conveniente.

Ayacucho, 29 de Julio del 2023


LAURA AUCASIME MEDINA
BIÓLOGA
Reg. C.B.P. N° 563 C.R. - XIII

Anexo 2. Constancia de la caracterización agronómica de las variedades criollo y trinitario.



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA
Real, Pontificia y Nacional
1677

EL QUIEN SUSCRIBE, INGENIERO DE PRODUCCION DE CULTIVOS TROPICALES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA.

CERTIFICA

Que, la señorita Frine Mery ZAMORA CONDORI, estudiante de la Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica ha solicitado la identificación de caracterización agronómica (fruto del cacao) de *Theobroma cacao* L. "cacao" de las variedades criollo y trinitario, la misma que han sido identificadas como sigue.

Muestra 1: Cacao Criollo

Son frutos originarios del local o comunidad llamado CHUNCHU, se caracteriza por ser un fruto alargado que terminan en una punta delgada. Tiene cáscara suave y semillas redondas, de color blanco a violeta, dulces y de sabor agradable. La mazorca se reconoce por tener diez surcos en pares bien marcados a lo largo. Cinco de esos surcos son más profundos con lomos que sobresalen: son arrugados e irregulares. Sus semillas son de color blanco y sabor dulce. Los granos o semillas de Cacao Criollo son de mayor calidad.

Muestra 2: Cacao Trinitario

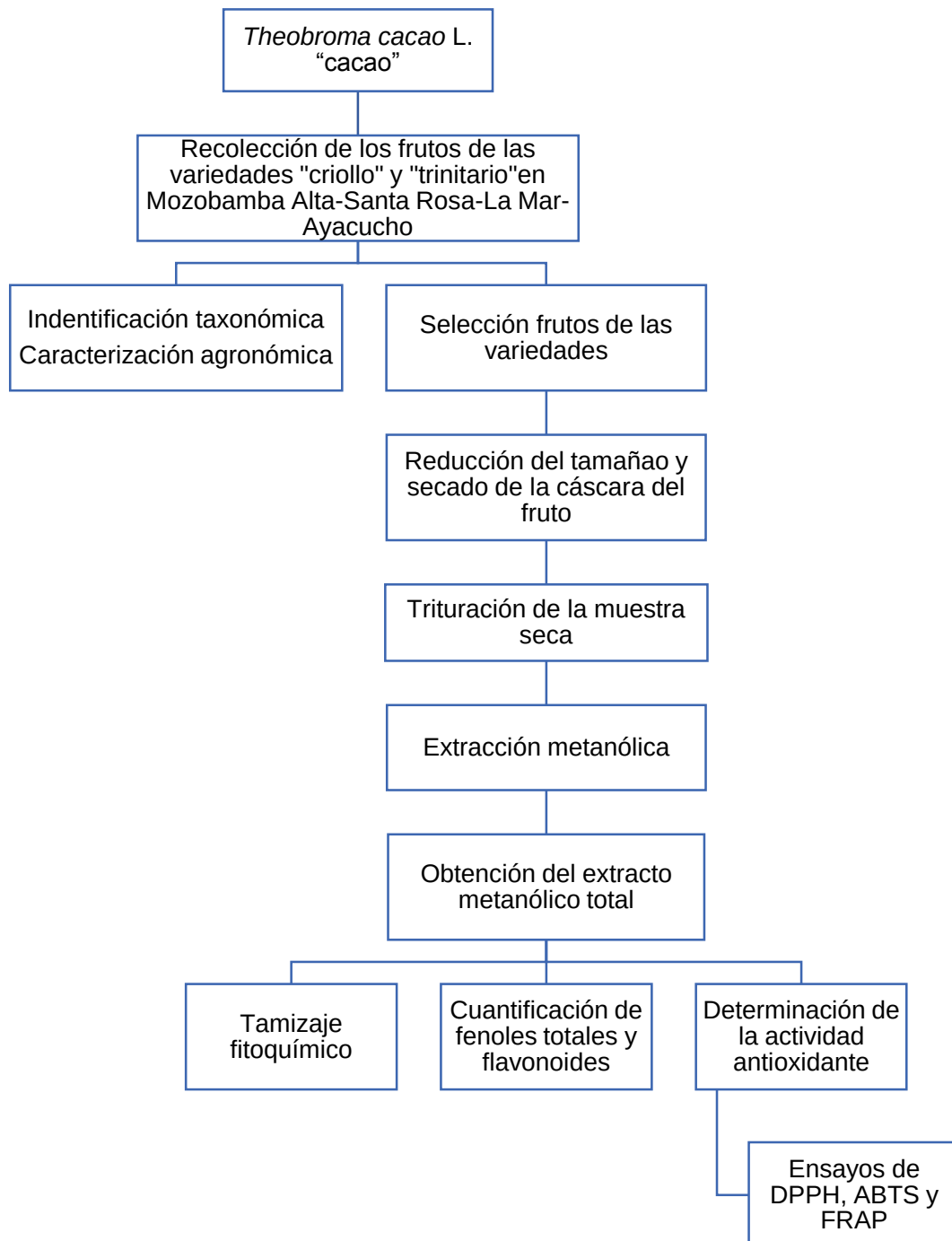
Es una mezcla del criollo y forastero, es un clon local del VRAE-15. Se caracteriza por tener semillas más grandes que el criollo y forastero; las mazorcas pueden ser de diferentes formas y colores, las plantas son más fuertes, troncos más gruesos y grandes.

Se expide el presente certificado a solicitud de la interesada, para los fines que lo estime conveniente.

Ayacucho, 25 de septiembre del 2023

FREDDY PRADO MACISO
INGENIERO AGROFORESTAL
CIP 246196

Anexo 3. Flujograma del procedimiento metodológico para recolección de datos.



Anexo 4. Recolección de frutos en Mozobamba Alta-Santa Rosa-La Mar-Ayacucho.



(a)



(b)

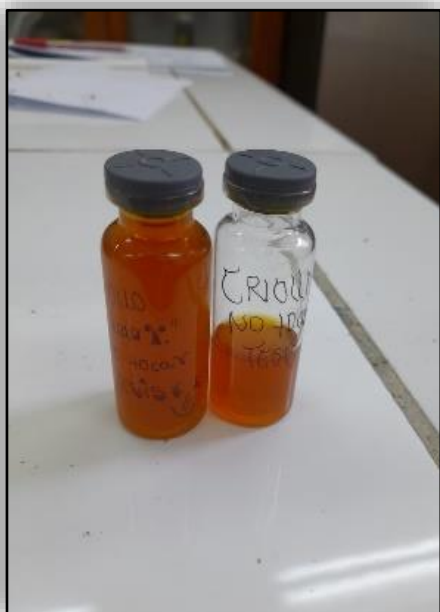
Leyenda: (a) variedad trinitaria; (b) variedad criolla.

Anexo 5. Proceso de secado, triturado y extracción metanólica.



Reducción del tamaño de la cáscara para el proceso de secado en la estufa (1 semana)

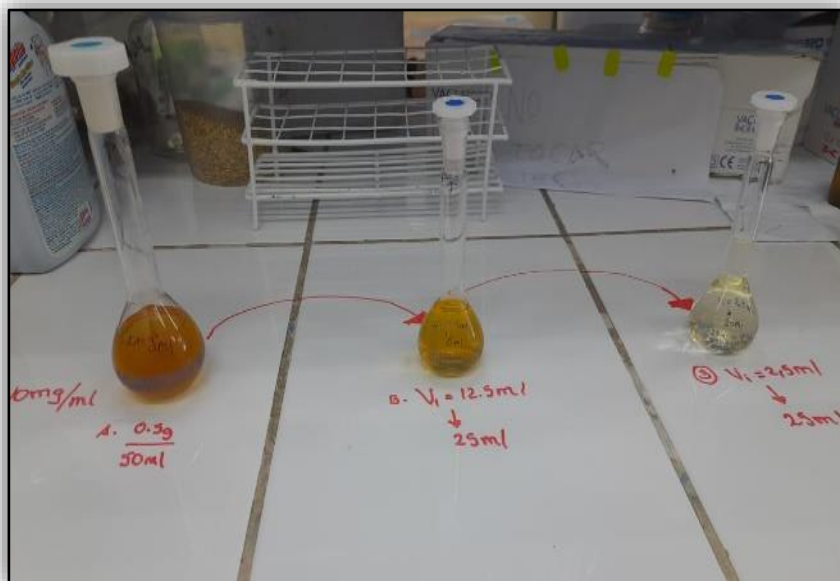
Muestra de cáscara seca triturada



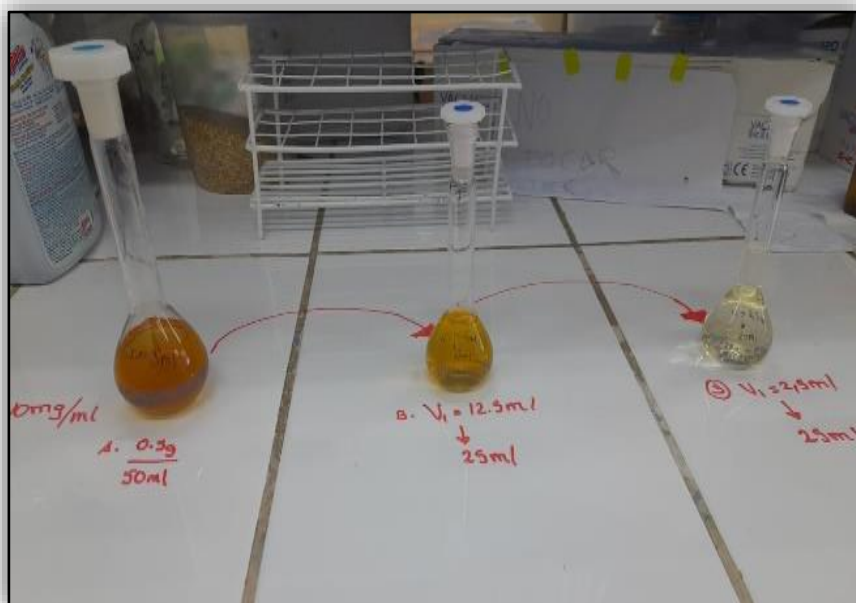
Obtención del extracto metanólico de las dos variedades.

Extracción metanólica.

Anexo 6. Preparación de las soluciones de trabajo.



(a)



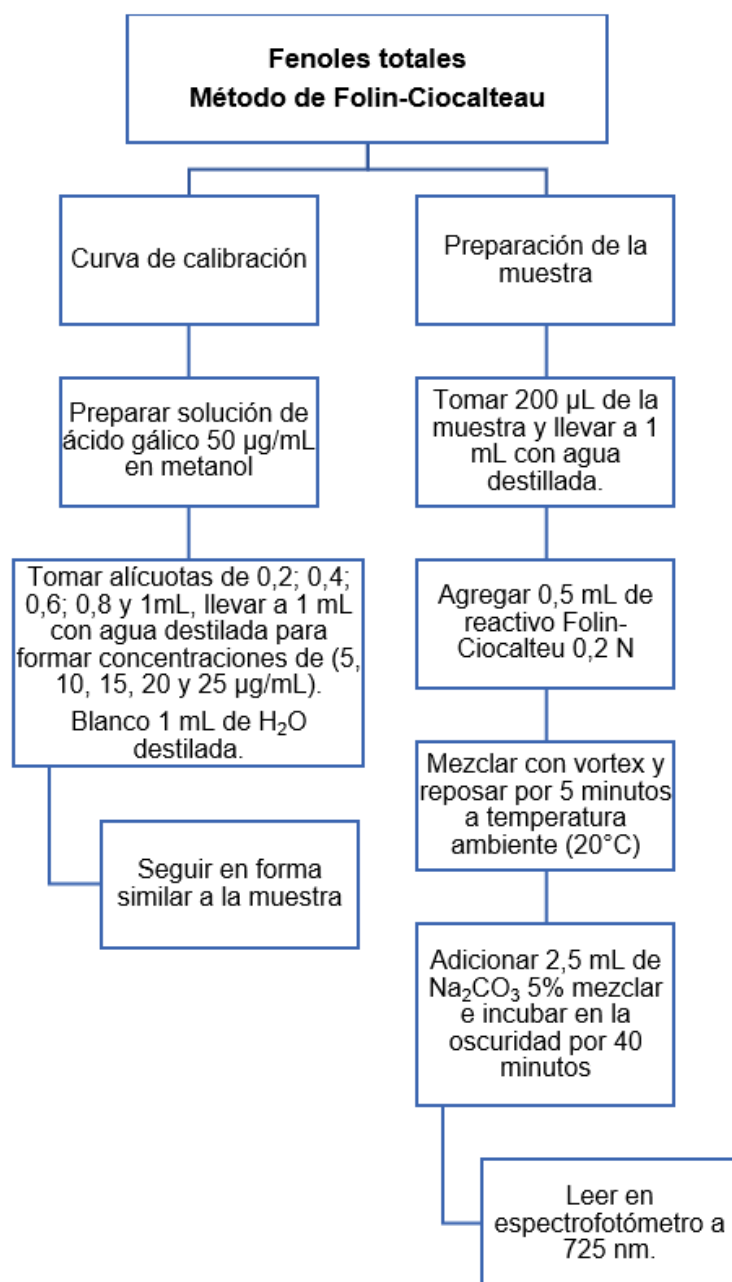
(b)

Leyenda: (a) variedad trinitaria; (b) variedad criolla.

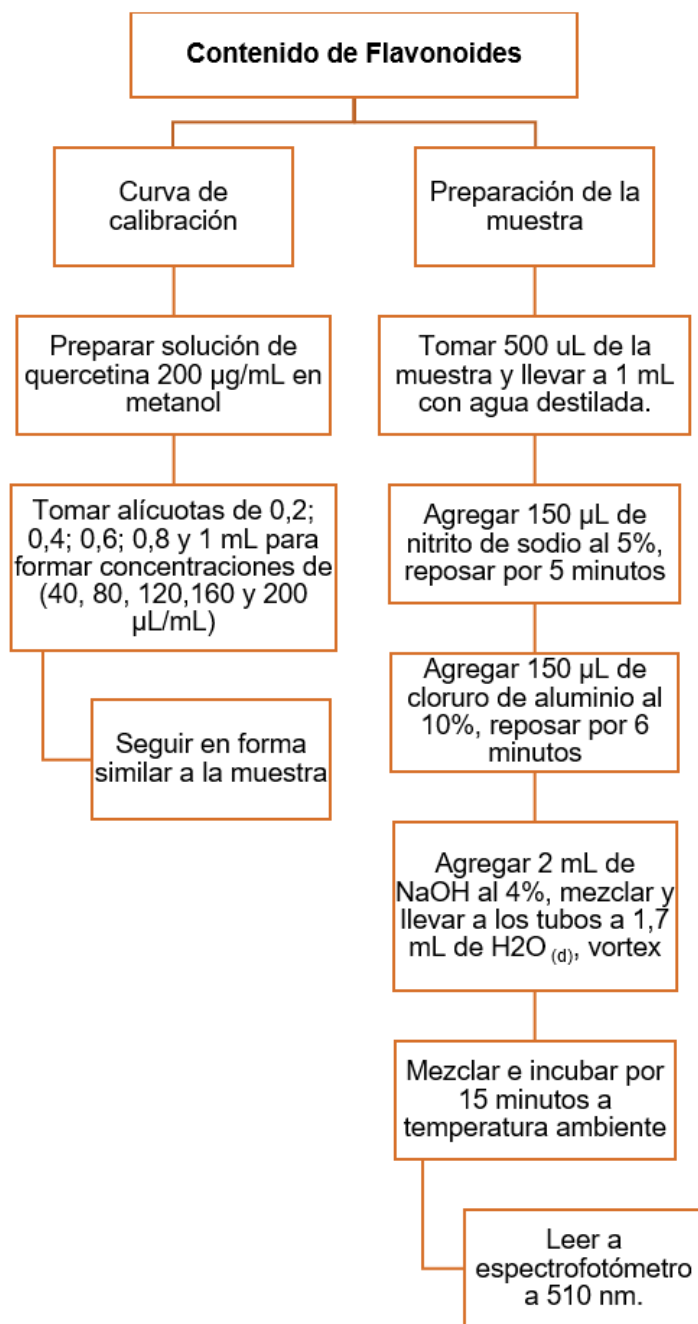
Anexo 7. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico, de acuerdo a Miranda y Cuellar.⁶⁰

Ensayo	Reactivo	Características positiva
Cloruro férrico	2 mL de muestra + 3 gotas cloruro férrico	Verde intenso
Shinoda	2 mL de muestra + 1 mL $HCL_{(C)}$ + pedazo de Mg	Coloración naranja
Gelatina	2 mL de Mp + 2 mL de sol. de gelatina (1%)	Presencia de precipitado
Fehling	2 mL de muestra + 2 mL de reactivo	Coloración rojo o precipado rojo
Ninhidrina	2 mL de muestra + 2 mL de ninhidrina al 2% en baño María	Coloración azul violáceo
Dragendorff, Mayer, Wagner	2 mL de muestra + 3 gotas de reactivo	Presencia de opalescencia, turbidez o precipitado
Kedde	2 mL de Mp + 1mL de sol. de reactivo de kedde	Presencia de coloración violáceo
Espuma – saponinas	1 mL de muestra 5 mL $H_2O_{(d)}$ agitar fuertemente por 5 – 10 minutos	Espuma en la superficie de 2mm por más de 2 minutos
Baljet	2 mL Mp + 1 mL de sol. de reactivo de baljet.	Fluorescencia azul – verdosa.

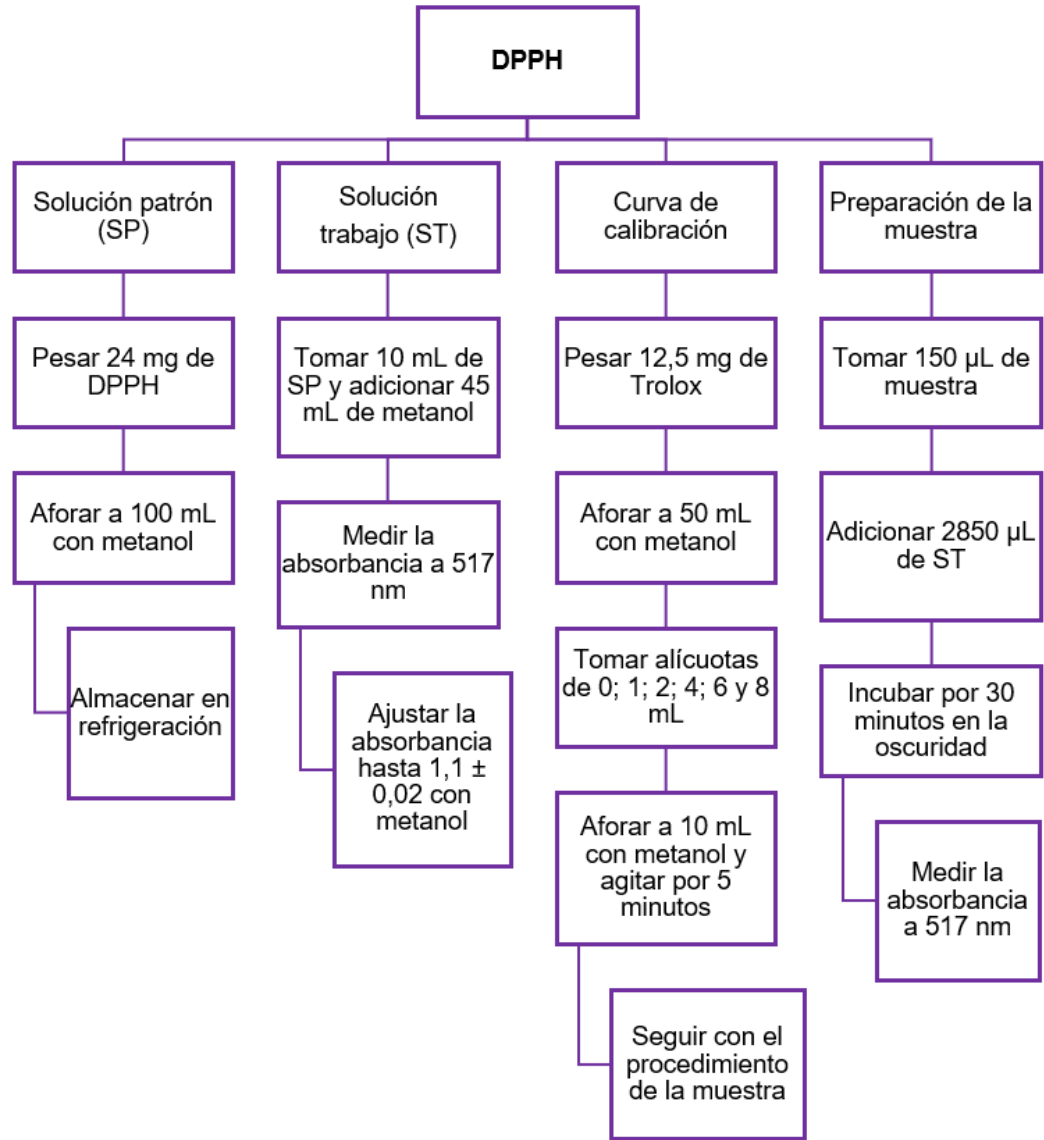
Anexo 8. Flujograma utilizado para poder cuantificar fenoles totales.



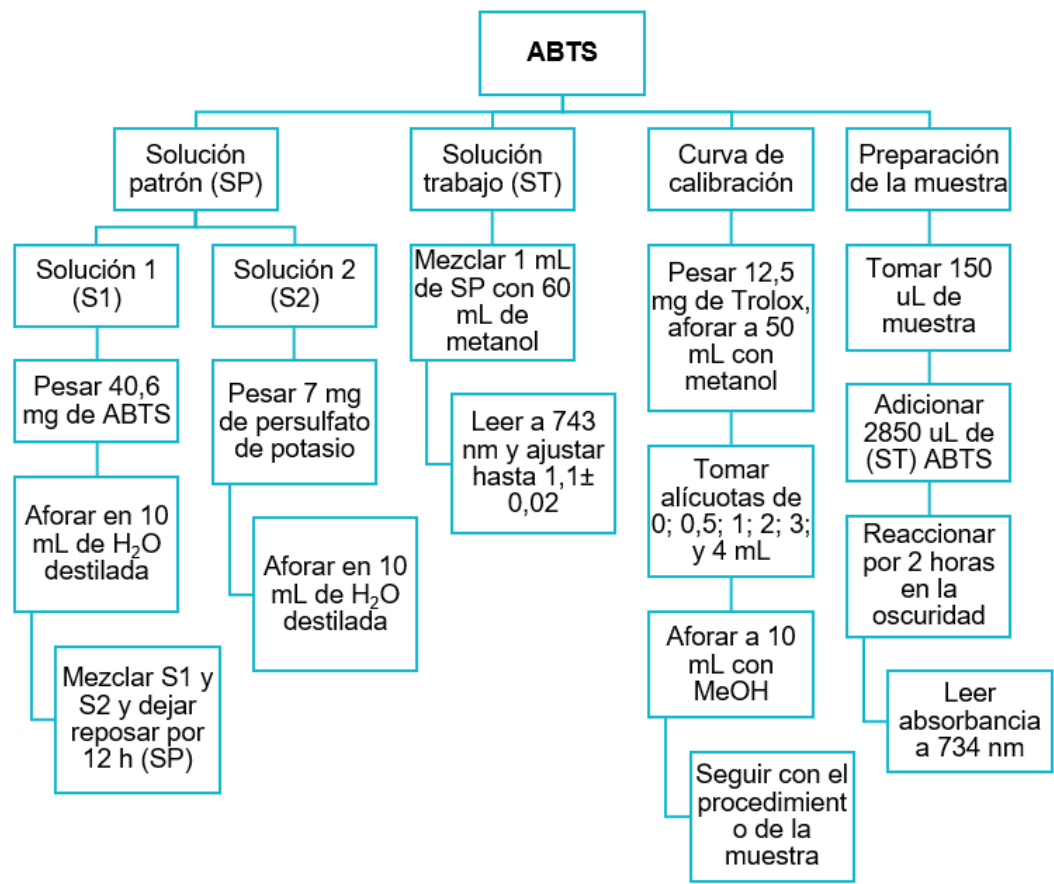
Anexo 9. Flujograma utilizado para poder cuantificar flavonoides.



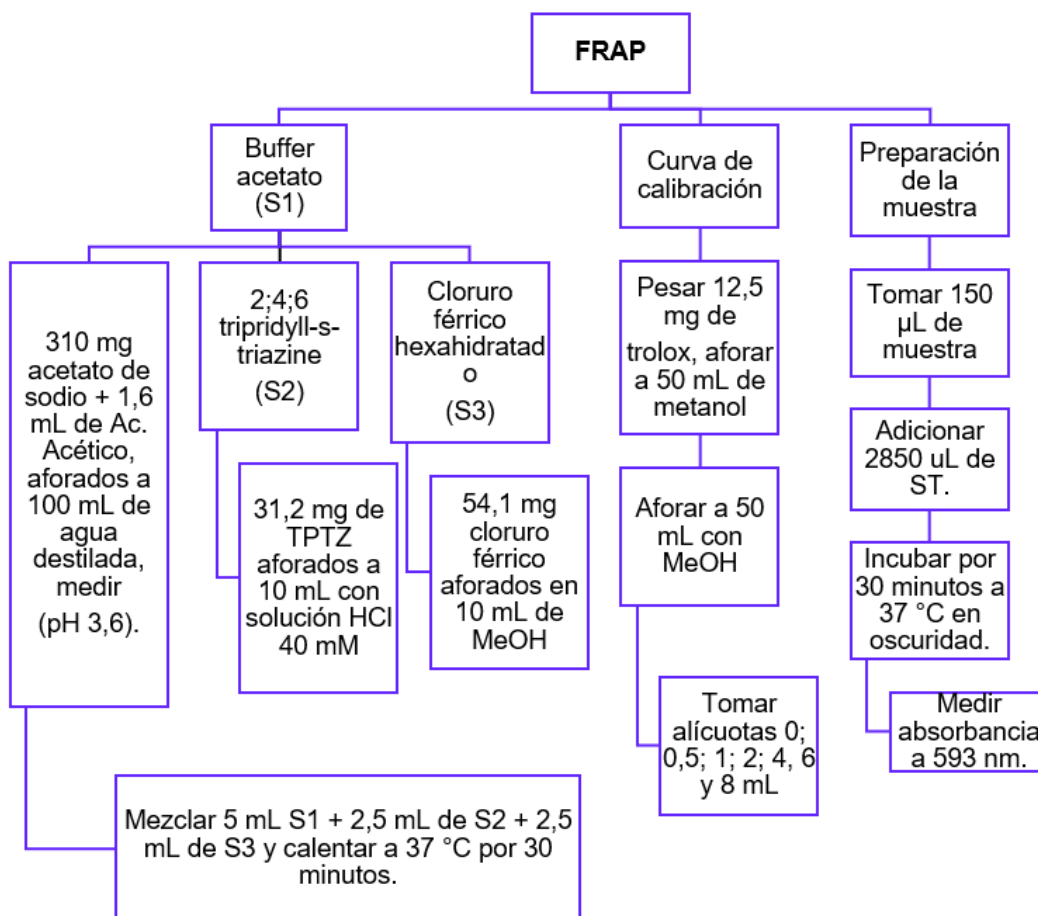
Anexo 10. Flujograma empleado para determinar la actividad antioxidante mediante DPPH.



Anexo 11. Flujograma empleado para determinar la actividad antioxidante mediante ABTS.



Anexo 12. Flujograma empleado para determinar la actividad antioxidante mediante FRAP.



Anexo 13. Tamizaje fitoquímico realizado al extracto obtenido de las variedades criollo y trinitario.



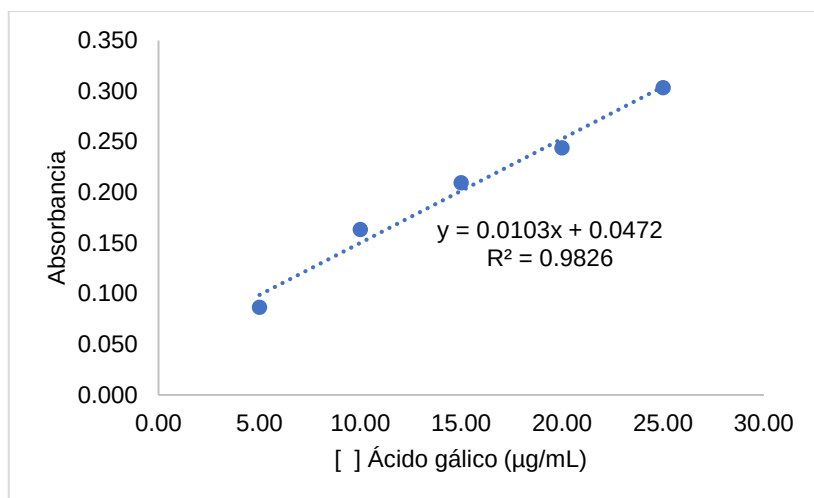
(a)



(b)

Leyenda: (a) variedad trinitaria; (b) variedad criolla.

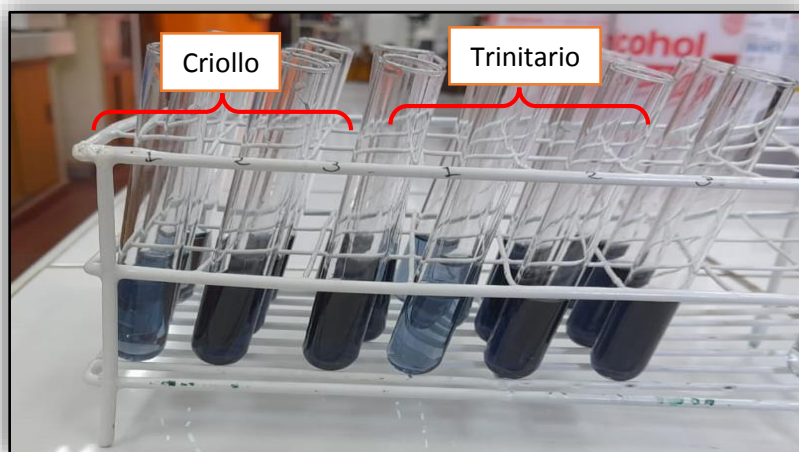
Anexo 14. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.



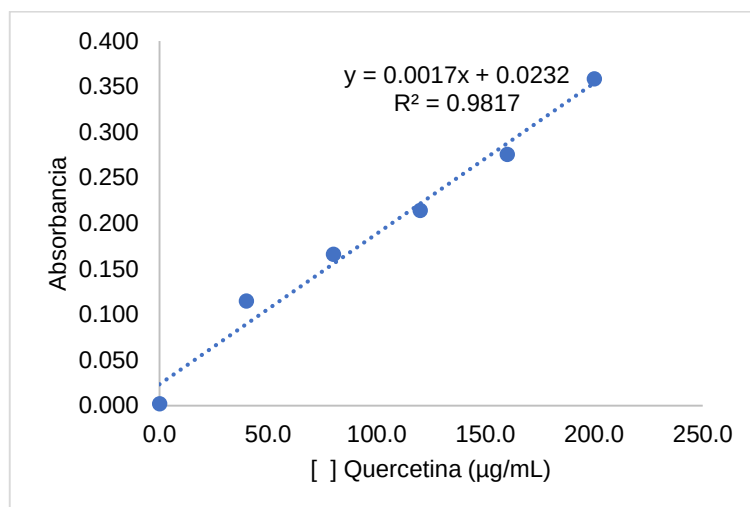
Anexo 15. Diluciones del estándar ácido gálico.



Anexo 16. Muestras evaluadas en la cuantificación de fenoles totales.



Anexo 17. Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides.



Anexo 18. Diluciones del estándar quercetina.

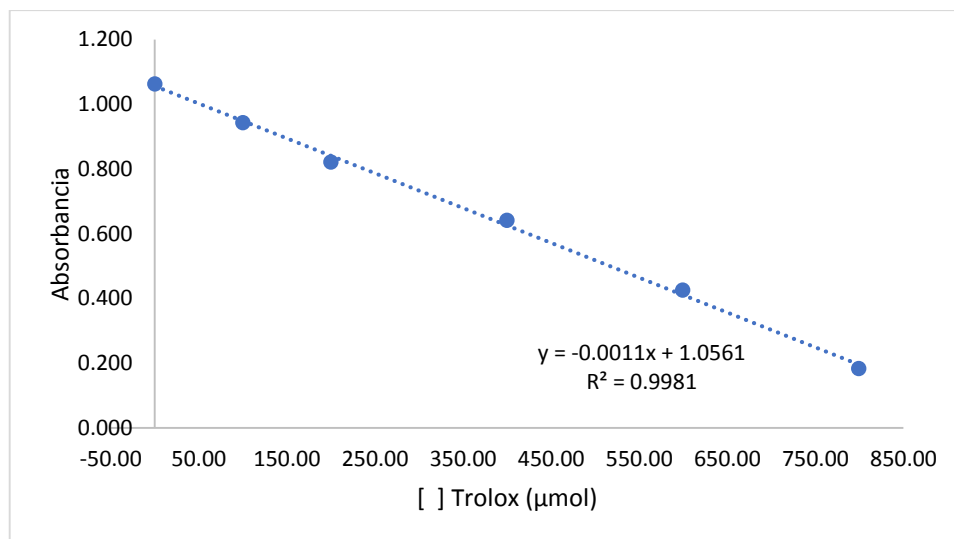


Anexo 19. Muestras evaluadas para la cuantificación de flavonoides.



Muestras de las variedades criollo y trinitario.

Anexo 20. Curva de calibración del trolox en el ensayo del radical DPPH.



Anexo 21. Diluciones de trolox en el ensayo con el radical DPPH.

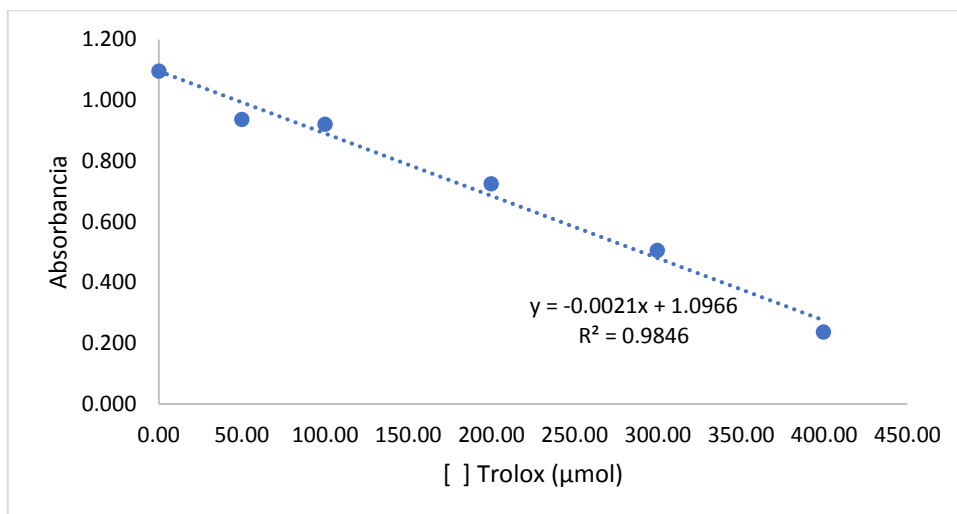


Anexo 22. Muestras realizadas en el ensayo del radical DPPH.



Captación del DPPH obtenido por las muestras.

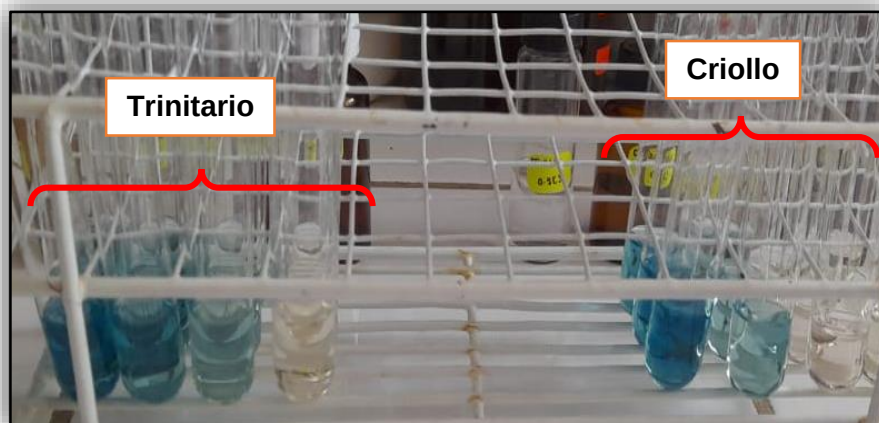
Anexo 23. Curva de calibración del trolox en el ensayo del radical ABTS.



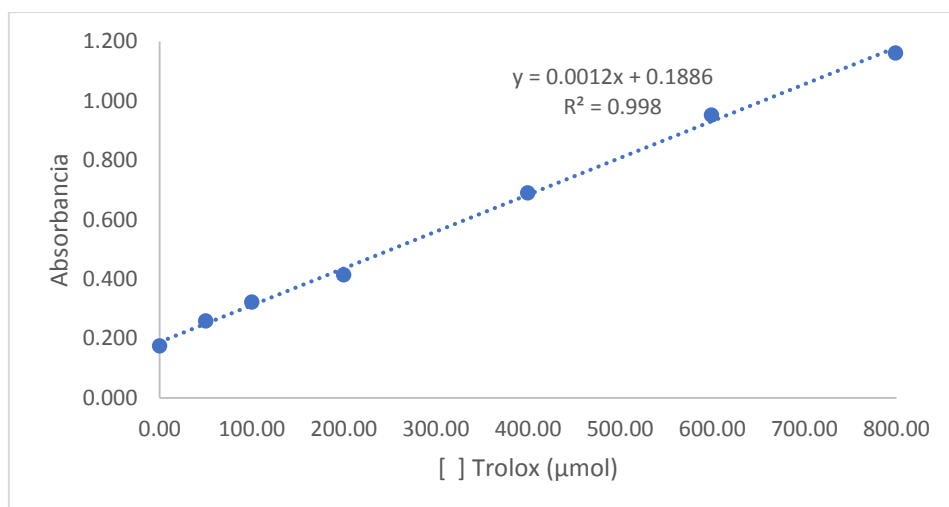
Anexo 24. Diluciones de trolox en el ensayo con el radical ABTS.



Anexo 25. Muestras realizadas en el ensayo del radical ABTS.



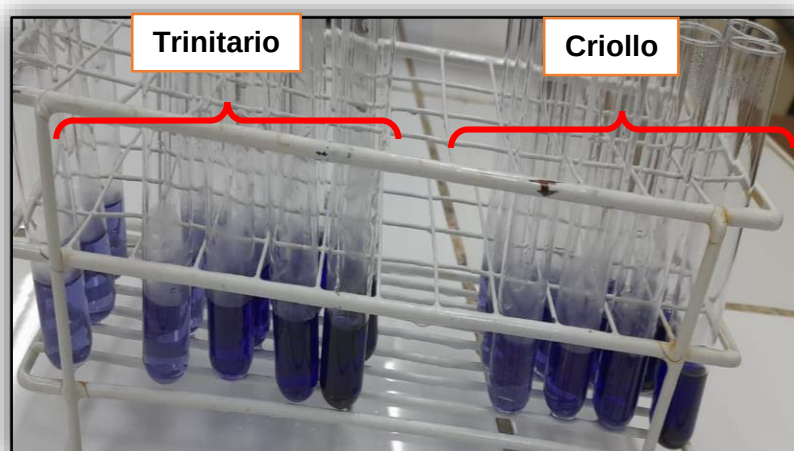
Anexo 26. Curva de calibración del trolox en el ensayo del radical FRAP.



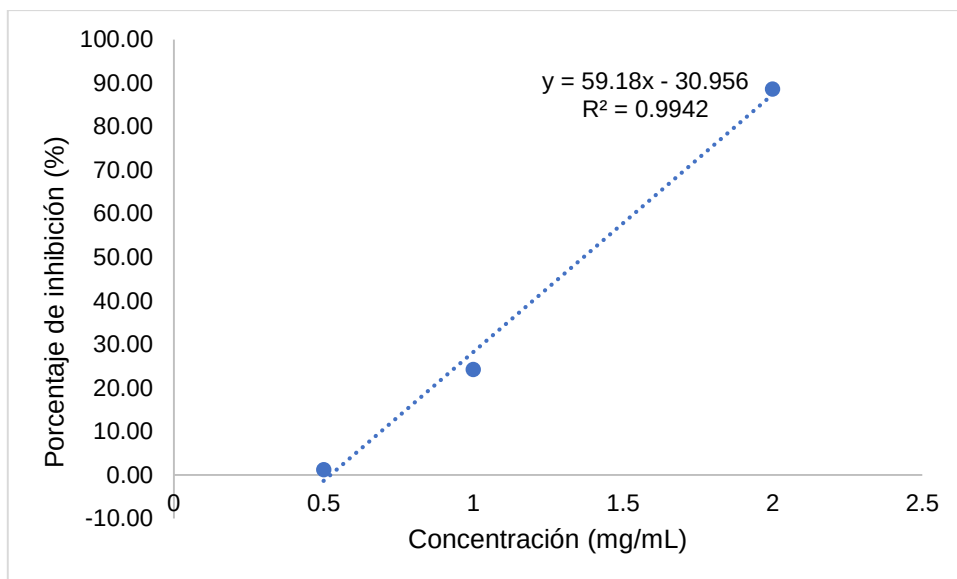
Anexo 27. Diluciones de trolox en el ensayo con el radical FRAP.



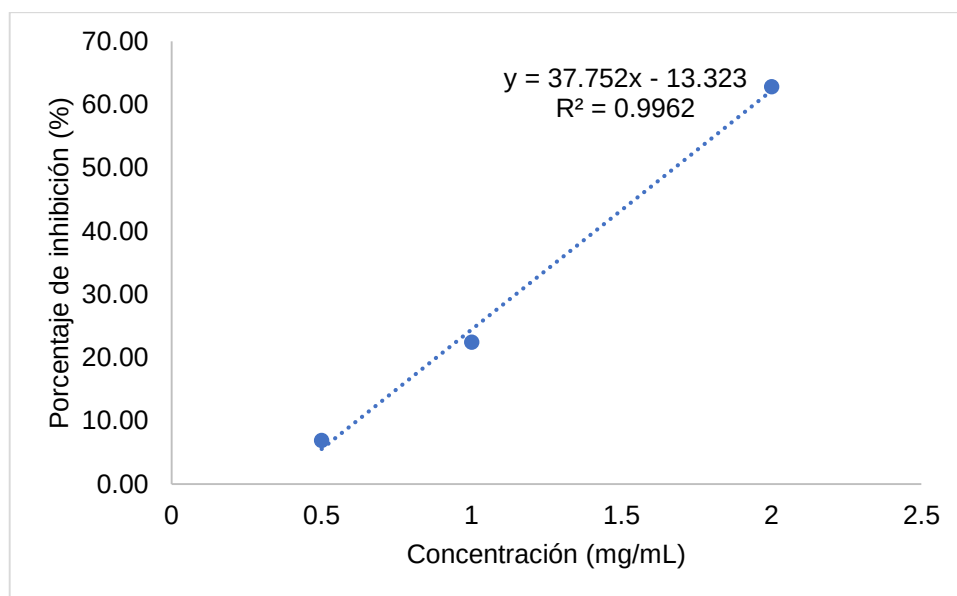
Anexo 28. Muestras realizadas en el ensayo del radical FRAP.



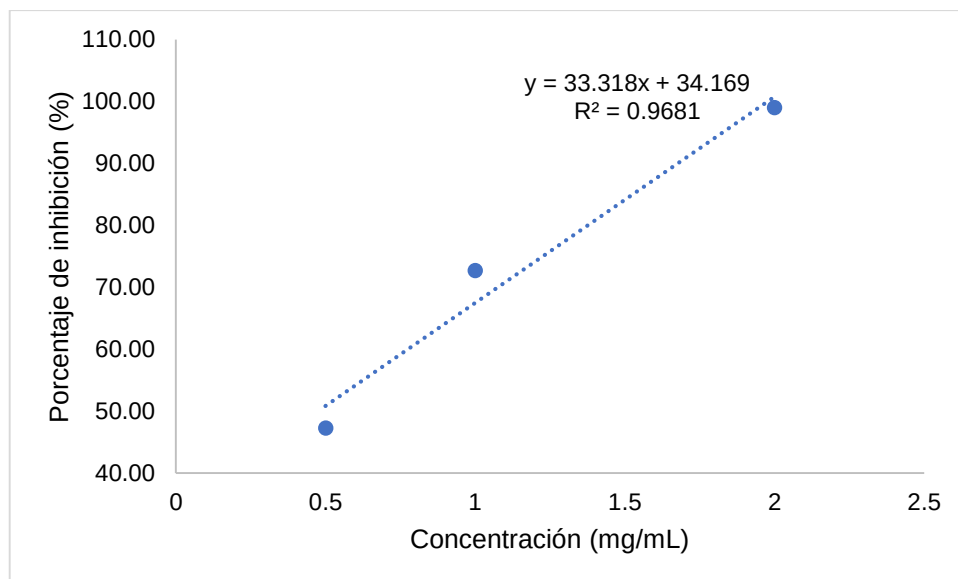
Anexo 29. Curva para determinar el IC₅₀ de la variedad criolla mediante DPPH.



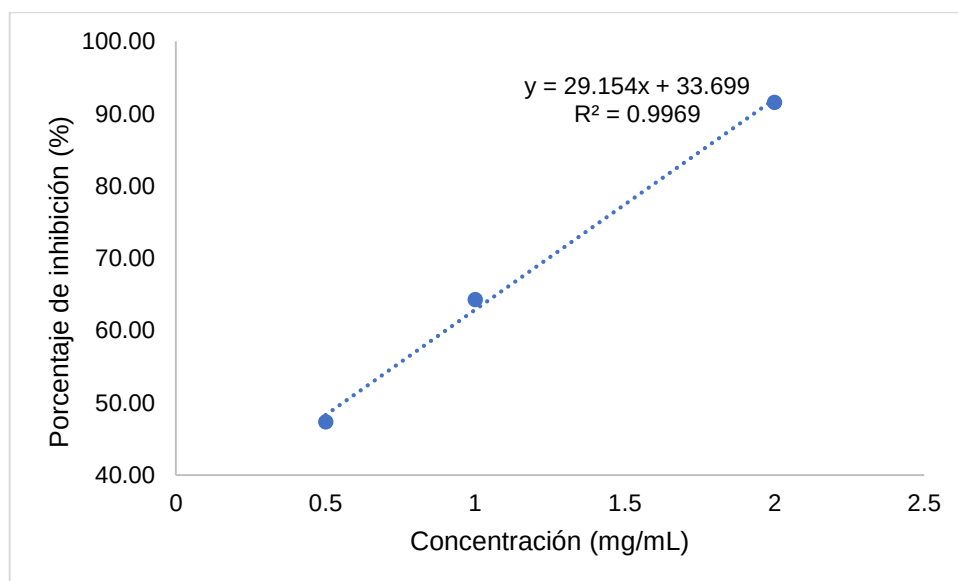
Anexo 30. Curva para determinar el IC₅₀ de la variedad trinitaria mediante DPPH.



Anexo 31. Curva para determinar el IC₅₀ de la variedad criolla mediante ABTS.



Anexo 32. Curva para determinar el IC₅₀ de la variedad trinitaria mediante ABTS.



Anexo 33. Análisis de T-student realizado a la cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

Prueba de muestras independientes		Prueba de Levene de		prueba t para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de confianza diferencia	intervalo de	de la
									Inferior	Superior	
Fenoles totales	Se asumen varianzas iguales	3,456	0,137	5,110	4	0,007	20,10000	3,93336	9,17924	31,02076	
	No se asumen varianzas iguales			5,110	2,725	0,018	20,10000	3,93336	6,83736	33,36264	
Flavonoides	Se asumen varianzas iguales	0,416	0,554	1,650	4	0,174	6,45333	3,91046	-4,40385	17,31052	
	No se asumen varianzas iguales			1,650	3,585	0,182	6,45333	3,91046	-4,91854	17,82520	

Anexo 34. Análisis de T-student realizado a la concentración equivalente a trolox en los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
DPPH ($\mu\text{mol ET/g}$)	Se asumen varianzas iguales	1,923	0,238	15,777	4	0,000	22,94000	1,45403	18,90297	26,97703
	No se asumen varianzas iguales			15,777	2,616	0,001	22,94000	1,45403	17,90387	27,97613
ABTS ($\mu\text{mol ET/g}$)	Se asumen varianzas iguales	0,000	1,000	24,497	4	0,000	48,70333	1,98817	43,18329	54,22338
	No se asumen varianzas iguales			24,497	4,000	0,000	48,70333	1,98817	43,18329	54,22338
FRAP ($\mu\text{mol ET/g}$)	Se asumen varianzas iguales	0,707	0,448	39,985	4	0,000	156,51667	3,91443	145,64846	167,38488
	No se asumen varianzas iguales			39,985	3,390	0,000	156,51667	3,91443	144,83173	168,20160

Anexo 35. Análisis de ANOVA, realizado al IC₅₀ obtenido mediante los métodos de DPPH y ABTS.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DPPH	Entre grupos	4,061	2	2,031	10749,941	0,000
	Dentro de grupos	0,001	6	0,000		
	Total	4,062	8			
ABTS	Entre grupos	0,411	2	0,205	770,292	0,000
	Dentro de grupos	0,002	6	0,000		
	Total	0,412	8			

Anexo 36. Test de Tukey realizado al IC₅₀ obtenido mediante los métodos de DPPH y ABTS.

DPPH				
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		a	b	c
Trolox	3	0,1233		
Criollo	3		1,3633	
Trinitario	3			1,6800
Sig.		1,000	1,000	1,000

ABTS				
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		a	b	c
Trolox	3	0,0667		
Criollo	3		0,4767	
Trinitario	3			0,5533
Sig.		1,000	1,000	1,000

Anexo 37. Matriz de consistencia.

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de dos variedades de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM. Ayacucho, 2023.	¿El extracto metanólico de la cáscara de del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM, tendrán igual actividad antioxidante y contenido de fenoles totales y flavonoides?	Objetivo General: Determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM. Objetivos Específicos: - Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM. - Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM. - Determinar la actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM, mediante los ensayos DPPH, ABTS y FRAP.	Ho: El extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM, tienen igual contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante. Hi: El extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" del VRAEM, no tienen igual contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante.	Antioxidantes: Los antioxidantes son una gran variedad de sustancias químicas que se hallan naturalmente en nuestros alimentos, los que son responsables de prevenir o reducir el estrés oxidativo del sistema fisiológico, debido a que nuestro cuerpo produce constantemente radicales libres debido al metabolismo regular de oxígeno.⁷⁹ Radicales libres: Un radical libre es cualquier especie química capaz de existencia independiente (de ahí el término "libre"), que contiene uno o más electrones desapareados.⁸⁰ Compuestos fenólicos. Entre los diversos compuestos metabolitos que sintetizan las plantas los compuestos fenólicos son interés químico, moléculas caracterizadas por presentar uno o más grupos hidroxilos acoplados al anillo aromático.⁴¹	Variable independiente: - Extracto metanólico de la cáscara del fruto de las variedades criollo y trinitario de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao". Indicadores - Contenido de fenoles totales (TPC), expresando en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg GAE/g). - Contenido de flavonoides (TFC), expresado en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg QE/g). Variable dependiente: - Actividad antioxidante - Capacidad de secuestro del radical 2,2- difenil- 1- picridrazilo (DPPH), expresado en: porcentaje de actividad antioxidante (%AA) y la cantidad mínima necesaria para disminuir la concentración del DPPH en un 50% (CI50), expresado en micro gramo por cada mililitro (µg/mL). - Capacidad de secuestro del catión radical libre 2,2' azino – bis (3 – etilbenzotiazolin) – 6 – sulfónico (ABTS), expresado en: porcentaje de actividad antioxidante (%AA) y la concentración media inhibitoria (CI50), expresado en micro gramo por cada mililitro (µg/mL). - Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP), expresado µg ET/mg).	Tipo de investigación: Básica, descriptiva. Definición de la población y muestra. Población: Cáscara del fruto (mazorca) de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao", variedad criollo y trinitario. Muestra: Un kg de cáscara de <i>Theobroma cacao</i> L. "cacao" de las variedades criollo y trinitario, que serán recolectadas a una altura de 1102, 2 m, en los bosques densos en el anexo de Mozobamba Alta, distrito de Santa Rosa – VRAEM, perteneciente a la provincia de La Mar de la región Ayacucho. Métodos instrumentales: Para evaluar la actividad antioxidante se empleará la espectrofotometría UV-VIS. Análisis estadísticos: Los resultados obtenidos fueron expresados como el promedio ± desviación estándar obtenidas de tres repeticiones. El contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante, fueron evaluados mediante el T-student, mientras que, la concentración inhibitoria del 50% (IC50) fue evaluado con el estadístico ANOVA para ver las diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95% (p<0,05), todo el procedimiento fue desarrollado con el programa Microsoft Office Excel y SPSS.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

RESOLUCIÓN DECANAL N° 912-2024-UNSCH-FCSA-D

BACHILLER: FRINE MERY ZAMORA CONDORI

En la ciudad de Ayacucho, siendo las tres y diez de la tarde del día dieciséis del mes de agosto del año dos mil veinticuatro, se reunieron en el auditorium de la Facultad de Ciencias de la Salud los docentes miembros del jurado evaluador, para el acto de sustentación del trabajo de tesis titulado **Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de dos variedades de *Theobroma cacao* L. "cacao" del VRAEM. Ayacucho, 2023**, presentado por la bachiller **FRINE MERY ZAMORA CONDORI** para optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

En mérito al Memorando N° 1105-2024-UNSCH-FCSA-D, el decano ha delegado la presidencia al profesor Enrique Javier Aguilar Felices, en lugar de la profesora Maricela López Sierralta, debido a causas de fuerza mayor. En tal sentido, el jurado evaluador queda conformado por:

Presidente	: Prof. Enrique Javier Aguilar Felices (delegado por el decano)
Jurados	: Prof. Enrique Javier Aguilar Felices
	: Prof. Kirianova Godoy Bautista
4to jurado	: Prof. Roxana León Aronés
Asesor	: Prof. Edwin Carlos Enciso Roca
Secretario Docente	: Prof. Gabriela Bellido Mujica

Con el quorum de reglamento se dio inicio la sustentación de tesis, el presidente de la comisión pide a la secretaria docente dar lectura a los documentos presentados por el recurrente, resolución decanal y algunas indicaciones al sustentante.

Da inicio la exposición la Bachiller **FRINE MERY ZAMORA CONDORI**, y una vez concluida, la presidenta de la comisión solicita a los miembros del jurado evaluador realizar sus respectivas preguntas, seguidamente se da pase al asesor de tesis, para que pueda aclarar algunas preguntas, interrogantes, aclaraciones.

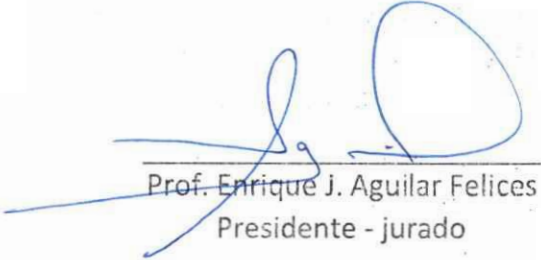
El presidente invita a la sustentante abandonar el auditorium para que pueda proceder con la calificación.

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FINAL

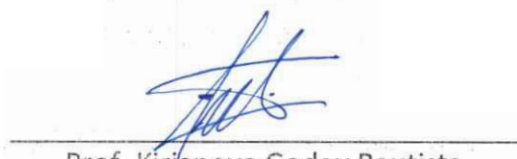
Bachiller: **FRINE MERY ZAMORA CONDORI**

JURADOS	Texto	Exposición	Preguntas	P. Final
Prof. Enrique J. Aguilar Felices	18	18	18	18
Prof. Kirianova Godoy Bautista	17	17	15	16
Prof. Roxana León Aronés	17	17	17	17

De la evaluación realizada por los miembros del jurado calificador, llegaron al siguiente resultado: Aprobar a la Bachiller **FRINE MERY ZAMORA CONDORI**; quien obtuvo la nota final de diecisiete (17) para la cual los miembros del jurado evaluador firman al pie del presente, siendo las 5:00 de la tarde, se da por concluido el presente acto académico.



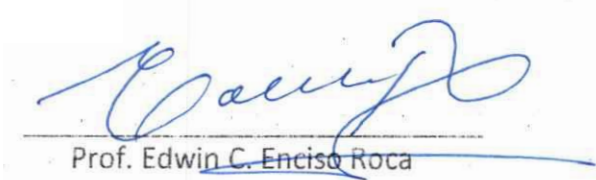
Prof. Enrique J. Aguilar Felices
Presidente - jurado



Prof. Kirfanova Godoy Bautista
Jurado



Prof. Roxana León Aronés
Jurado



Prof. Edwin C. Enciso Roca
Asesor



Prof. Gabriela Bellido Mujica
Secretaria docente



UNSCH

FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD SEGUNDA INSTANCIA:
TESIS DE PREGRADO

(C°23-2024-EPFB-UNSCH)

La que suscribe, directora de escuela y docente instructor en segunda instancia de Tesis de Pregrado, luego de verificar la originalidad de la tesis de la Escuela profesional de Farmacia y bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, en representación de la decana y delegada por Resolución Decanal N° 077-2021-UNSCH-FCSA/D, deja constancia que el trabajo de tesis titulado:

Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de dos variedades de *Theobroma cacao* L. "cacao" del VRAEM. Ayacucho, 2023.

Bach. ZAMORA CONDORI, Frine Mery

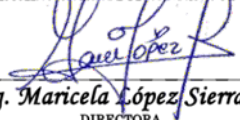
Ha sido sometido al análisis mediante el sistema TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de **19% de índice de similitud.**

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje establecido en el Artículo 13° del Reglamento de Originalidad de Trabajos de investigación de pregrado de la UNSCH. Por tanto, **ES PROCEDENTE** conceder la Constancia de originalidad en segunda instancia.

Ayacucho, 19 de julio del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA


Mg. Maricela López Sierralta
DIRECTORA
Docente. Instructor
Segunda instancia

cc.
Archivo.

Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de dos variedades de *Theobroma cacao* L. “cacao” del VRAEM. Ayacucho, 2023.

por Frine Mery Zamora Condori

Fecha de entrega: 19-jul-2024 08:37a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2419172256

Nombre del archivo: Tesis_Frine_Mery_ZAMORA_CONDORI.pdf (2.33M)

Total de palabras: 18043

Total de caracteres: 95925

Contenido de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante del extracto metanólico de la cáscara del fruto de dos variedades de *Theobroma cacao* L. “cacao” del VRAEM. Ayacucho, 2023.

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%	18%	7%	13%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	9%
	Trabajo del estudiante	
2	repositorio.unsch.edu.pe	3%
	Fuente de Internet	
3	revistas.sqperu.org.pe	1%
	Fuente de Internet	
4	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
5	www.midagri.gob.pe	1%
	Fuente de Internet	
6	repositorio.unfv.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
7	revistas.unsch.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	

8

Fuente de Internet

1 %

9

dspace.esPOCH.edu.ec

Fuente de Internet

< 1 %

10

Submitted to Universidad Privada del Norte

Trabajo del estudiante

< 1 %

11

repositorio.unc.edu.pe

Fuente de Internet

< 1 %

12

repositorio.ug.edu.ec

Fuente de Internet

< 1 %

13

repositorio.uigv.edu.pe

Fuente de Internet

< 1 %

14

idoc.tips

Fuente de Internet

< 1 %

15

repositorio.espam.edu.ec

Fuente de Internet

< 1 %

16

cybertesis.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

< 1 %

17

docplayer.es

Fuente de Internet

< 1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo