



UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL  
(UCI)

**DISEÑO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE A  
PARTIR SUBPRODUCTOS DE LA PRODUCCIÓN CACAOTERA.**

**LILIANA ESTHER SOTELO CORONADO**

PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO  
PARCIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MASTER EN GERENCIA DE  
PROGRAMAS SANITARIOS EN INOCUIDAD DE ALIMENTOS

**San José, Costa Rica**

**Marzo de 2015**



UNIVERSIDAD PARA LA COOPERACIÓN INTERNACIONAL  
(UCI)

Este Proyecto Final de Graduación fue aprobado por la Universidad como requisito parcial para optar al grado de Master en gerencia de programas sanitarios en inocuidad de alimentos

---

DR. FÉLIX M. CAÑET PRADES  
PROFESOR TUTOR

---

MIA. ANA CECILIA SEGREDA RODRÍGUEZ  
LECTORA

---

ING. LILIANA ESTHER SOTELO CORONADO  
SUSTENTANTE

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicarle esta trabajo a mi madre Nelfa del Socorro Coronado Osorio, por ser mi modelo de ser humano, por enseñarme el valor de la vida, de la lucha diaria para salir adelante, por entregar su vida para que yo cada día sea mejor, por enseñarme el verdadero valor del amor.

Quiero dedicarles este trabajo también a aquellas personas que ayudan a los demás sin esperar nada a cambio, y luchan cada día por hacer de este mundo un mejor lugar para vivir.

**Liliana**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, a Colciencias, a la Universidad de Córdoba, a mis compañeros del grupo de investigación Procesos y Agroindustria de vegetales (GIPAVE) y en especial a la Dr. Margarita Núñez de Villavicencio al Dr. Armando Alvis Bermúdez y Guillermo Arrazola Paternina; al Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas de la Universidad de Antioquia, al Instituto de Investigación Biológico del Trópico (IIBT) de la universidad de Córdoba por permitirme realizar los análisis antimicrobianos en sus instalaciones, al Dr. Pedro Martínez por guiarme pacientemente en la realización de los análisis experimentales de mi tesis, a Cindy Ríos, María Alejandra Geney, Adela Martínez, Brayan Jiménez y María Claudia Negrete por acompañarme con su ayuda.

A la Universidad para la Cooperación Internacional de Costa Rica (UCI) por darme la oportunidad ir creciendo cada vez como persona y profesional, a todos mis profesores y en especial al Dr. Félix M. Cañet Prades por ser mi tutor en este proyecto y a la MIA. Ana Cecilia Segreda por ser la lectora de mi trabajo, y a la cual le guardo un gran cariño.

*Lo siento, pero no quiero ser emperador. No es lo mío.  
No quiero gobernar ni conquistar a nadie. Me gustaría ayudar a todo el mundo.  
En este mundo hay sitio para todos, la buena tierra es rica y  
puede proveer a todos (...) Luchemos por un mundo de la razón,  
un mundo en el que la ciencia y el progreso lleven la felicidad a todos nosotros.*

*Charles Chaplin (1940) "El gran dictador"*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
3.1.    General.....	4
3.2.    Específicos .....	4
<b>4. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
4.1.    Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	6
4.2.    Las ETA y el cambio climático .....	6
4.3.    Enfoque preventivo de las enfermedades transmitidas por alimentos.....	7
4.4.    Enfoque holístico de inocuidad de los alimentos - toda la cadena alimentaria y más .....	8
4.5.    Enfoque del análisis de los peligros y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés) .....	9
4.6.    Prevenir es mejor que curar.....	10
4.7.    Antimicrobianos utilizados en la industria alimentaría .....	11
4.7.1.    Antimicrobianos naturales .....	12
4.7.2.    Antimicrobianos sintéticos.....	12
4.8.    El fin de la era de los antibióticos.....	13
4.9.    Bacterias de importancia en la industria de alimentos .....	14
4.10. <i>Theobroma cacao</i> L. ( <i>cacao</i> ):.....	15
4.10.1.    Clasificación Botánica.....	16
Para conocer el origen de cualquier cultivo, es importante tener de referencia la siguiente información .....	16
4.10.2.    Tipos de cacao cultivados en colombia .....	17
4.10.3.    Producción de cacao. ....	18
4.10.3.1.    En el Mundo .....	18
4.10.3.2.    En Colombia.....	19
4.10.3.3.    En Córdoba .....	21
En lo que respecta a producción de cacao en Córdoba, se cuenta con la siguiente información: .....	21
4.10.4.    Balanza comercial - exportaciones de cacao .....	22
4.10.5.    El cacao como planta alimenticia y medicinal .....	23
4.10.6.    COmposición bromatológica del la semilla y las cáscaras de mazorca de cacao .....	24

4.10.7.	Valor nutricional de las semillas del cacao.....	25
4.10.8.	Polifenoles presentes en cacao .....	27
4.10.9.	Métodos para obtener compuestos polifenólicos en alimentos .....	28
4.11.	Cuantificación e identificación de polifenoles con actividad antimicrobiana y antioxidantes. ....	29
4.12.	Mecanismo de acción de los antimicrobianos .....	30
<b>5.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1.</b>	<b>EXPERIMENTO 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL CACAO. ....</b>	<b>32</b>
5.1.1.	Introducción .....	32
5.1.2.	Materiales y métodos.....	33
5.1.2.1.	Materiales.....	33
5.1.2.2.	Recolección de la materia prima.....	33
5.1.2.3.	Adecuación de la materia prima. ....	33
5.1.2.4.	Obtención de los extractos. ....	35
5.1.3.	Descripción de los métodos de análisis .....	36
5.1.4.	Diseño experimental.....	37
5.1.5.	Resultados y discusión.....	38
<b>5.2.</b>	<b>EXPERIMENTO 2. EXTRACCIÓN COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL CACAO.....</b>	<b>47</b>
5.2.1.	Introducción .....	47
5.2.2.	Materiales y métodos.....	48
5.2.2.1.	Materiales.....	48
5.2.2.2.	Diseño experimental.....	48
5.2.2.3.	Obtención de los extractos. ....	49
5.2.2.4.	Método de ORAC .....	49
5.2.2.5.	Método de ABTS .....	50
5.2.2.6.	Técnica de FRAP .....	50
5.2.3.	Resultados y discusión .....	51
<b>5.3.</b>	<b>EXPERIMENTO 3 DISEÑO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL CACAO. ...</b>	<b>53</b>
5.3.1.	Introducción .....	53
5.3.2.1.	Variable independiente.....	54
5.3.2.2.	Variable dependiente.....	54
5.3.2.3.	Materiales.....	55

5.3.2.4. Preparación de los extractos .....	55
5.3.3. Cuantificación de compuestos polifenólicos totales por el método de Folin Ciocalteu .....	55
5.3.4. Resultados y discusión .....	56
<b>5.4. DISEÑO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (POLIFENOLES) A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DE CACAO....</b>	<b>57</b>
5.4.1. Introducción .....	57
5.4.2. Materiales y métodos.....	58
5.4.3. Resultados y discusión .....	59
5.4.3.1. Balance económico del proceso de obtención de compuestos bioactivos a partir de la cáscara de mazorca de cacao. ....	63
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>7. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

NOMBRE	pág.
<b>Figura 1.</b> Fruto de <i>Theobroma cacao</i> L.	17
<b>Figura 2.</b> Regiones productoras de cacao en Colombia	20
<b>Figura 3.</b> Exportaciones Mundiales de Cacao.	23
<b>Figura 4.</b> Composición proximal en base seca de las cáscaras de mazorca de cacao de la variedad TSH 565 expresadas en porcentaje (%)	24
<b>Figura 5.</b> Adecuación de la materia prima para análisis experimentales.	34
<b>Figura 6.</b> Obtención de los extractos de cáscara de mazorca de cacao.	36
<b>Figura 7.</b> CMI de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	39
<b>Figura 8.</b> CMB de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	40
<b>Figura 9.a.</b> Curva de letalidad en medios de cultivo para el <b>Staphylococcus aureus ATCC 29213</b>	41
<b>Figura 9.b.</b> Curva de letalidad para el <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	42
<b>Figura 10.</b> CMB de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 identificada Molecularmente IIBT	42
<b>Figura 11.</b> CMB de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 identificada Molecularmente IIBT	43
<b>Figura 12.a.</b> Curva de letalidad para la <i>Escherichia coli</i> O157:H7 identificada molecularmente IIBT, en medio de cultivo.	44
<b>Figura 12.b.</b> Curva de letalidad para la <i>Escherichia coli</i> O157:H7 identificada Molecularmente IIBT	45
<b>Figura 13.</b> Proceso de obtención de compuestos bioactivos a partir de la cáscara de mazorca de cacao.	62

## ÍNDICE GENERAL DE CUADROS

<b>NOMBRE</b>	<b>pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación botánica del cacao.	16
<b>Cuadro 2.</b> Producción de cacao a nivel mundial.	18
<b>Cuadro 3.</b> Producciones de cacao en Colombia.	20
<b>Cuadro 4.</b> Producción de cacao en Córdoba.	21
<b>Cuadro 5.</b> Exportaciones mundiales de Cacao	22
<b>Cuadro 6.</b> Diseño experimental para determinar la concentración mínima inhibitoria	38
<b>Cuadro 7.</b> Concentración Mínima Bactericida del extracto de la Cáscara de la mazorca del Cacao sobre la cepa de microorganismos Gram positivo ( <i>Staphylococcus aureus</i> ), Gram negativo ( <i>Escherichia coli</i> )	39
<b>Cuadro N°8.</b> Capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de mazorca de cacao.	51
<b>Cuadro N°9.</b> Contenido de compuestos polifenólicos de los extractos de la cáscara de mazorca de cacao.	56
<b>Cuadro 10.</b> Costos detallados de producción de extracto de cáscara de mazorca de cacao a nivel de laboratorio en USD (dólares estadounidenses) con extracto acidificado con HCl	63
<b>Cuadro 11.</b> Costos detallados de producción de extracto de cáscara de mazorca de cacao a nivel de laboratorio en USD (dólares estadounidenses) con extracto sin acidificar.	65
<b>Cuadro 12.</b> Comparación de costos de producción de extracto de cáscara de mazorca de cacao a nivel de laboratorio en USD (dólares estadounidenses).	66

## ÍNDICE GENERAL DE ANEXOS

<b>NOMBRE</b>	<b>pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Chárter del PFG	86
<b>Anexo2.</b> Fuentes de antimicrobianos naturales en la planta investigadas en los últimos 10 años.	91
<b>Anexo 3.</b> Estructuras de la (+)-catequina y (-)-epicatequina.	94
<b>Anexo 4.</b> Estructuras de dímeros y trímeros de procianidinas en cacao	95
<b>Anexo 5.</b> Estructura de la (-)-Catequina y la (+)-Epicatequina	95
<b>Anexo 6.</b> Estructura de polifenoles minoritarios en cacao.	96

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIADO	DESCRIPCIÓN
ETAs	Enfermedades transmitidas por los alimentos
ATBS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
FAO	Organización mundial de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
HACCP	Análisis de los peligros y puntos críticos de control.
FAOSTAT	Estadísticas de la FAO
USD	Dólar estado-anídense
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
nm	Unidad de medida (nanómetros).
ppm	Partes por millón (unidad de concentración)
ISO	Organización Internacional de Estandarización (siglas en inglés)
EROS	Especies reactivas del oxígeno
RL	Radicales libres
ADN	Ácido desoxirribonucleico
µL	Microlitros.
µmol	Micromoles
AUC	Área bajo la curva (siglas en inglés)
TE	Trolox equivalente derivado de 6 hidroxil-2, 5, 7,8 tetrametilcromano-2 ácido carboxílico.
HCl	Ácido clorhídrico.
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU) (siglas en inglés).
pH	Potencial hidrógeno
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
CG	Cromatografía de gases
DPPH	Compuesto químico (radical) 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

DMPD	Compuesto químico (radical) N,N-dimetil-p-fenilendiamina
DMPO	Compuesto químico (radical) N óxido del 5,5(prime)-dimetil-1-pirrolina
EC	Electroforesis capilar
MS	Espectrometría de masas
EAG	Ácido gálico equivalente
ANOVA	Análisis de varianza
PCBs	Bifenilos policlorados
FRAP	Capacidad de reducción férrica del plasma (siglas en inglés).
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (siglas en inglés)

## RESUMEN EJECUTIVO

Los consumidores ya tienen una mejor comprensión de los efectos de los alimentos en la salud y calidad de vida, por tal motivo han cambiado muchos sus hábitos alimenticios. Hoy en día, existe una demanda creciente de frutas frescas o procesadas, verduras, entre otros productos, que son microbiológicamente, inocuos y al mismo tiempo que ofrecen propiedades bioactivas más allá de los factores nutricionales. Uno de los cultivos promisorios en Colombia es el cacao, el cual se encuentra incluido dentro de las apuestas productivas del país. La cáscara de cacao, es el principal desecho de este fruto y representa el 70% del peso del mismo. El objetivo principal de esta investigación, consistió en diseñar un proceso de producción de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana y antioxidante a partir de subproductos del cacao. La metodología utilizada implicó una extracción de los bioactivos, mediante la técnica de agitación por 6 horas y una concentración de solución de extracción de 50% de etanol en solución acuosa, acidificado con HCl al 1% y sin acidificar. La capacidad antimicrobiana, se evaluó por triplicado mediante la técnica de CMI, CMB y curva de letalidad y la antioxidante se evaluó por el método de ABTS, FRAP y ORAC. Los costos de obtención, se evaluaron mediante balance económico de costo de producción del extracto, y la mejor técnica de extracción se evaluó teniendo como indicador el contenido de polifenoles. Los resultados de la concentración mínima inhibitoria, demuestran que el extracto tiene capacidad bacteriostática para: *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1.152 ppm y *Escherichia coli* a una concentración de 12.500 ppm y el efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* a una concentración de 6.250 ppm, además de un poder antioxidante el cual vería teniendo en cuenta el radical de exposición, con respecto al radical de FRAP, la extracción acida es mucho más efectiva 15.285,34  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, con respecto a la no acida 13.660,13  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra. Para el caso de los radicales de ORAC, es mayor en los tratamientos no ácidos 32.450,66  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, que en los ácidos 25.150,94  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, igual comportamiento presenta el radical ABTS con valores de potencial antioxidante de 16.500,88  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra frente a los tratamientos no ácidos 14.903,99  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$ . Los costos de producción por litro de extracto, varían teniendo en cuenta la técnica. En conclusión se puede afirmar que las cáscaras de mazorca de cacao poseen capacidad antimicrobiana y antioxidante, son fuente de compuestos polifenólicos y su obtención puede ser económicamente atractiva.

## ABSTRACT

Consumers now have a better understanding of the effects of food on health and quality of life, for this reason many have changed their eating habits. Today, there is growing demand for fresh and processed fruits, vegetables, and other products that are microbiologically safe while offering bioactive properties beyond nutritional factors. One of the promising crops in Colombia is cocoa, which is included within the productive betting the country. The cocoa shell, is the main disposal of this result and represents 70% of the weight thereof. The main objective of this research was to design is a production of bioactive compounds with antimicrobial and antioxidant products from cocoa capacity. The methodology involved a bioactive extraction using the technique of agitation for 6 hours and a concentration of the extraction solution of 50% ethanol in aqueous solution, acidified with 1% HCl without acidification. The antimicrobial activity was evaluated in triplicate by CMI technique, WBC and kill curve and the antioxidant was evaluated by the ABTS method, FRAP and ORAC. The costs of production were evaluated by economic balance of cost of production of the extract, and the best extraction technique was evaluated based on an indicator polyphenol content. The results of the minimum inhibitory concentration, showed that the extract has bacteriostatic ability to: *Staphylococcus aureus* at a concentration of 1152 ppm and *Escherichia coli* at a concentration of 12,500 ppm and the bactericidal effect on *Staphylococcus aureus* at a concentration of 6,250 ppm, plus antioxidant power which would radical considering the exposure, with respect to the radical of FRAP, the acid extraction is much more effective 15285.34 microns TE / 100 g sample, relative to the non-acidic microns 13660.13 TE / 100 g sample. In the case of radicals ORAC is higher in non-acid treatments 32450.66 um TE / 100 g sample in acid 25150.94 um TE / 100 g sample shows the same behavior with ABTS radical potential values um 16500.88 antioxidant TE / 100 g sample versus non-acid treatments 14903.99 um TE / 100 g. Production costs per liter of extract, vary considering the art. In conclusion we can say that the cocoa pod husks have antimicrobial and antioxidant capacity, are a source of polyphenolic compounds and their preparation can be economically attractive.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) o son un grave problema de salud pública, cada año, los alimentos insalubres causan enfermedades a por lo menos dos mil millones de personas en todo el mundo, lo que equivale al tercio de la población (Cheng W et al, 2013). Existen más de 200 agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos dentro de los que encontramos microorganismos, agentes químicos y físicos (Roshni y Arun, 2012). Varios enfoques comúnmente utilizados para controlar los patógenos transmitidos por los alimentos incluyen antibióticos, antimicrobianos naturales, bacteriófagos, bacteriocinas, radiaciones ionizantes, y el calor (Roshni y Arun , 2012).

La presencia y el crecimiento de microorganismos en los alimentos pueden causar el deterioro y resultar en una reducción en la calidad y cantidad de los mismos (Soliman y Badeaa, 2002 ), dentro de los principales microorganismos causantes de enfermedades se encuentran la *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7 y *Salmonella enteritidis* (Hall, 1997). Es conocido que las ETA son causadas principalmente por consumir alimentos contaminados, tales como bacterias, moho, virus y parásitos (Vattem et al., 2004). Además de la transferencia pasiva de agentes patógenos a la alimentación, el crecimiento activo de un patógeno también puede ocurrir en los alimentos (Madigan et al., 1997). Por estas razones, la contaminación microbiana de los alimentos sigue planteando importantes retos para garantizar la salud pública y los intereses económicos de la sociedad. Los consumidores de hoy están cada vez más preocupados por conservantes químicos en los alimentos, y tienden a elegir los alimentos naturales, seguros y con beneficios múltiples de salud (Wu, et al. 2008).

Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, se encuentran entre los componentes naturales de las plantas con actividad antimicrobiana (Davidson & Taylor, 2007). Ellos podrían tener un activador o un efecto inhibitor sobre el

crecimiento microbiano de acuerdo con su estructura y concentración (Alberto et al., 2002 y Reguant et al., 2000). La industria alimentaria está experimentando una creciente demanda de nuevos ingredientes de origen natural, una parte importante de los mismos, se encuentra en los subproductos agroindustriales (Viuda-Martos et al, 2012), ya que dependiendo de la disponibilidad de una tecnología adecuada, los subproductos pueden ser convertidos en productos comerciales, ya sea como materias primas para procesos secundarios (ingredientes alimentos intermedios) o como ingredientes de nuevos productos (Sánchez-Zapata et al., 2009), ganando cada vez más interés debido a que estos son productos de alto valor y su recuperación puede ser económicamente atractiva (Murthy y Naidu, 2012).

El cacao (*Theobroma cacao L.*) originario de la cuenca alta del Amazonas, ocupa el tercer lugar después del azúcar y el café en el mercado mundial de materias primas. (FINAGRO, 2013). Por su parte, en Colombia el cacao se constituye como un importante producto dentro de la producción agrícola, al contar con condiciones agroecológicas favorables para su producción y con una calidad reconocida a nivel internacional de cacao fino y de aroma. (PROEXPORT, 2012). El alto consumo de derivados de este fruto, como manteca de cacao, jarabes, pastas y todo tipo de chocolates, ha producido un aumento constante del precio de los granos de cacao, lo que alienta a los agricultores a aumentar la producción (FEDECACAO, 2013).

El objetivo principal de este trabajo final de graduación (PFG), consiste en diseñar un proceso de producción de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana y antioxidante a partir subproductos de la producción cacaotera.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las actuales preocupaciones sobre la inocuidad y seguridad alimentaria, asociadas a la creciente aparición de nuevos brotes de ETA causadas por microorganismos patógenos plantea desafíos considerables, sobre todo porque existe una creciente inquietud con respecto al uso de conservantes químicos artificiales y antimicrobianos para inactivar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Arques, Rodríguez, Núñez, y Medina, 2008 ; Aslim y Yucel, 2007 ; Brandi et al., 2006 , Cushnie y Cordero, 2005 , Demirci et al., 2008, y Turner et al., 2007). Los compuestos antimicrobianos se utilizan en los alimentos por dos razones principales: (1) para el control de los procesos de deterioro naturales (conservación de alimentos), y (2) para evitar o controlar el crecimiento de microorganismos, incluidos los microorganismos patógenos (inocuidad alimentaria).

Los compuestos antimicrobianos naturales se derivan de animales, plantas y fuentes microbianas. Una cantidad creciente de información relacionada con el tema, indica que existe un potencial considerable para la utilización de antimicrobianos naturales en los alimentos, en especial los derivados de las frutas y verduras frescas, por su efectos sobre la degradación oxidativa de los lípidos y la mejora de la calidad y el valor nutricional de los alimentos, además de su fuerte efecto antifúngico. (Ayala-Zavala et al., 2008, Brandi et al., 2006, Chen et al., 2008, Liu et al., 2008, López-Malo vigilia et al., 2005, Martínez et al., 2008).

En la explotación cacaotera solo se aprovecha económicamente la semilla, que representa aproximadamente un 10% del peso del fruto fresco y en el caso de las 44.241 ton producidas en Colombia (2012), solo se aprovechan 4.424 ton, el resto que equivale a 39.816 subproductos siendo la cascara el principal desecho, que es rico en taninos, polifenoles, alcaloides, azúcares y polisacáridos (Estudio de Albornoz, citado en Crescente et al. 1999); estos desechos no son aprovechados al momento del beneficio del fruto y se dejan en

los campos lo que ocasiona serios problemas ambientales, tales como la aparición de olores fétidos y el deterioro del paisaje, así como también se considera un foco para la propagación de *Phytophthora spp*, causa principal de pérdidas económicas de la actividad cacaotera (Franco et al. 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

✓ Diseñar un proceso de producción de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana y antioxidante a partir subproductos de la producción cacaotera, para el aprovechamiento de este subproductos que no tiene valor comercial y que en la actualidad está causando problemas de contaminación ambiental, en la obtención de compuestos de interés para la industria de alimentos como antioxidantes o antimicrobianos que sustituyan aditivos químicos no asimilables por el organismo humano, mejorando de esta forma la inocuidad de los mismo.

#### **3.2. Específicos**

✓ Diseñar un proceso de extracción de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de subproductos del cacao, para usarlo como un método de conservación en alimentos altamente atacados por microorganismos.

✓ Diseñar un proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante a partir de subproductos del cacao, para usarlo como sustituto de conservantes químicos perjudiciales para el organismo humano, en alimentos de alta inestabilidad.

✓ Diseñar un proceso de extracción de compuestos polifenólicos a partir de subproductos del cacao, para poder aprovechar el potencial de los subproductos de la industria del cacao en la obtención de compuestos con potencial en la industria de alimentos.

✓ Diseñar un proceso industrial de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de cacao y calcular su costo de producción, para conocer la rentabilidad del proceso de obtención de los mismos.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1. ENFERMEDADES TRASMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)**

Se refiere a las ETA originadas por la ingestión de alimentos, incluida el agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor a nivel individual o en grupos de población. (García A. 2014)

### **4.2. LAS ETA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO**

Se considera que el cambio climático en las últimas décadas tendrá impactos adversos en la salud humana en especial a los niños y ancianos y otros segmentos vulnerables de la población. En este contexto, se estima que el cambio climático en 2000 fue responsable de aproximadamente el 2,4% de la diarrea en todo el mundo, en algunos países de ingresos medios. Los microorganismos causantes de enfermedades (bacterianas, virales y parásitos) y otros factores (intolerancias alimentarias o enfermedades intestinales), sigue siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo y la principal causa de aumento de la morbilidad y la mortalidad prematura a nivel mundial. Las últimas investigaciones reportan que el aumento de la temperatura ambiente asocia positivamente con las tasas de reproducción y supervivencia de las bacterias, protozoos y otros microorganismos que causantes de ETA.

Los incrementos de temperaturas asociados al cambio climático, provocan un aumento en la tasa de multiplicación de las bacterias que causan la gastroenteritis, como la *Escherichia coli*, en los alimentos contaminados y también pueden afectar indirectamente a los patrones de comportamiento, tales como aumento en el consumo de agua lo que puede promover la transmisión de diarrea. Por otra parte, la reducción o el aumento de las precipitaciones, junto con una disminución en la disponibilidad de agua potable tienen un efecto directo en el aumento significativo de las enfermedades transmitidas alimentos,

por consumo de aguas contaminadas o de mala calidad. (Vieira C., Dantas M., Prieto M. 2014).

#### **4.3.ENFOQUE PREVENTIVO DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.**

La responsabilidad primaria por la inocuidad alimentaria recae en los que producen, procesan y comercializan alimentos - granjeros, pescadores, operadores del matadero, procesadores de alimentos, comerciantes mayoristas y minoristas, proveedores de alimentos, y otros integrantes de la cadena de suministro alimentario, quienes bajo el principio de la finca a la mesa, tienen la obligación de asegurar que los alimentos que produzcan y manipulen con procedimientos inocuos y satisfagan los requerimientos de las leyes alimentarias, además deben verificar que dichos requerimientos se cumplan.

La principal tarea de las autoridades de supervisión, es establecer normas de inocuidad de los alimentos y asegurar que los sistemas internos de control operados por productores, procesadores y comerciantes de alimentos sean adecuados y se practiquen de manera que estas normas se cumplan. Además, las autoridades deben realizar ciertas actividades de control directo, por ejemplo control de las importaciones, para asegurar que éstas cumplan con la legislación y también deben proveer información y asesoramiento sobre un amplio rango de temas relacionados con los alimentos que puedan afectar la salud humana.

En los últimos años, la organización de control de los alimentos a nivel nacional ha cambiado en muchos países y se le ha dado a un solo organismo la responsabilidad sobre toda la cadena de la granja a la mesa. Dicho sistema tiene muchas ventajas y si, a pesar de todo, la responsabilidad se divide entre dos o más organismos a nivel nacional, es vital que exista una estrecha coordinación entre ellos. De manera similar, si la responsabilidad por el control

de los alimentos se divide entre autoridades centrales y locales, entonces es importante que las autoridades centrales tengan la facultad de coordinar y auditar el trabajo de las autoridades locales.

Los consumidores son responsables por la higiene de los alimentos en el hogar y de asegurar que se sigan las recomendaciones de conservación y preparación de los alimentos. Además, es en gran medida el consumidor el que decide la composición de su dieta y los hábitos alimentarios inadecuados son un factor importante como agente causal de enfermedades relacionadas con los alimentos, especialmente en los países industrializados. En algunos casos estamos "cavando nuestra tumba con los dientes" cuando la ingesta de ciertos alimentos inocuos es mucho más elevada que nuestras necesidades (FAO, 2012).

#### **4.4. ENFOQUE HOLÍSTICO DE INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS - TODA LA CADENA ALIMENTARIA Y MÁS**

Es importante prestar atención a toda la cadena de producción-procesamiento-distribución de los alimentos. Anteriormente, el control de los alimentos con frecuencia se concentraba en el examen de los productos finales y en la inspección de las operaciones de procesamiento de alimentos. Sin embargo, en las últimas décadas ha habido una concientización creciente de la importancia de un enfoque integrado, multidisciplinario que considere toda la cadena alimentaria (y en algunos casos más allá de lo que convencionalmente se considera cadena alimentaria). Un resultado de este cambio en el enfoque es una concientización mucho mayor de la necesidad de un mejor control en la composición y la inocuidad de los alimentos para animales. En respuesta a esto, la Comisión del Codex Alimentarius estableció un Grupo de Trabajo ad hoc sobre Alimentos para Animales y en años recientes la Comunidad Europea ha introducido mucha más legislación y control sobre los alimentos de animales. Otro resultado del cambio en el paradigma es la comprensión de la necesidad

de contacto mucho más cercano y más interacción entre los responsables del control de los alimentos y los responsables de prevenir o reducir la contaminación ambiental. Dicha contaminación, por ejemplo con sustancias químicas persistentes como el mercurio, los PCBs y las dioxinas, pueden causar problemas de inocuidad alimentaria. Junto a esto existe actualmente un mayor énfasis sobre las medidas preventivas orientadas a las fuentes. A continuación se dan algunos ejemplos de este enfoque (FAO, 2012).

#### **4.5. ENFOQUE DEL ANÁLISIS DE LOS PELIGROS Y PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL (HACCP, por sus siglas en inglés)**

Los productores, los procesadores y los comerciantes de alimentos deben operar según los principios de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), de Higiene (BPH) y Manufactura (BPM), respectivamente. La producción, el procesamiento y otras operaciones de manipulación de alimentos deben ser analizados con el propósito de identificar peligros y evaluar los riesgos asociados. Esto deberá resultar en la identificación de puntos críticos de control y el establecimiento de un sistema para controlar la producción en estos puntos o sea el HACCP. La implementación de este sistema dentro de las empresas, puede ser difícil pero no imposible en lo referente a pequeñas y medianas empresas con un conocimiento básico, experiencia y recursos limitados. Probablemente, la mejor manera de lograrlo es mediante la colaboración entre la industria alimentaria, las organizaciones educativas y de capacitación y las autoridades de supervisión. El Codex Alimentarius y sus organizaciones de origen, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han generado lineamientos útiles y materiales de capacitación e información relacionados con la aplicación del HACCP en el control de los alimentos (FAO, 2012).

#### **4.6. PREVENIR ES MEJOR QUE CURAR**

Pueden utilizarse diferentes enfoques, para intentar garantizar que los niveles de contaminantes en los alimentos sean lo más bajos dentro de lo razonablemente posible y nunca estén por encima de los niveles máximos considerados aceptables/tolerables desde el punto de vista de la salud. Esencialmente, estos enfoques consisten en:

- ✓ Medidas para eliminar o controlar la fuente de contaminación.
- ✓ Medidas para identificar y separar los alimentos contaminados de aquellos adecuados para el consumo humano. El alimento contaminado posteriormente es descartado para ser usado como alimento, a menos que pueda ser reacondicionado y sea adecuado para el consumo humano.

En algunos casos, se usa una combinación de los enfoques mencionados, por ejemplo cuando las emanaciones de fuentes anteriormente no controladas han provocado contaminación ambiental con sustancias químicas persistentes, que luego han ingresado en la cadena alimentaria.

Anteriormente, la mayoría de los sistemas de regulación de inocuidad alimentaria se basaban en definiciones legales de alimentos no inocuos, programas de aplicación para eliminar dichos alimentos del mercado y la aplicación de sanciones a los responsables de infringir las regulaciones. Dichos sistemas no han sido exitosos para tratar problemas previos o actuales y es improbable que puedan tratar los riesgos emergentes.

El control de los productos finales nunca puede ser lo suficientemente completo como para garantizar niveles de contaminantes inferiores a los niveles máximos establecidos y la inocuidad y otros aspectos de la calidad de los alimentos no pueden ser "inspeccionados dentro" del alimento al final de la cadena de

producción. En la mayoría de los casos, los contaminantes químicos no pueden ser eliminados de los productos alimenticios y no existe una manera factible de hacer que un lote de productos alimenticios contaminados pueda ser adecuado para consumo humano.

La ventaja de eliminar o controlar la contaminación alimentaria en la fuente, con enfoque preventivo, es que usualmente esta acción es más efectiva para reducir o eliminar el riesgo de efectos adversos sobre la salud, ya que requiere menos recursos para control de los alimentos y evita el rechazo de productos alimenticios y las resultantes pérdidas económicas y de otro tipo (FAO, 2012).

#### **4.7. ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

La adición de antimicrobianos a los alimentos es una de las principales tecnologías de conservación las cuales previenen o hacen más lento el crecimiento bacteriano logrando alargar la vida útil del alimento; cabe anotar que estos agentes no contribuyen al mejoramiento de un alimento ya alterado, es por esto que los antimicrobianos o conservantes se deben utilizar en materias primas con calidad.

Los agentes antimicrobianos, pueden ser compuestos sintéticos que se adicionan intencionalmente a los alimentos o compuestos naturales que pueden usarse comercialmente como aditivos para conservar alimentos, además de mostrar propiedades antimicrobianas en los sistemas biológicos donde se encontraban originalmente, (Acero, 2011).

#### 4.7.1. ANTIMICROBIANOS NATURALES

Los compuestos antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen en:

- ✓ **Origen animal:** En este grupo incluyen proteínas, enzimas como la lisozima, lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán.
- ✓ **Origen vegetal:** Incluyen compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores; ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas.
- ✓ **Origen microbiano:** Incluyen compuestos producidos por microorganismos, (Acero, 2011).

Las plantas, aromáticas y las especias así como sus aceites esenciales, poseen un gran número de sustancias que inhiben la actividades metabólicas de bacterias, levaduras y mohos aunque algunas de estas permanecen explotadas tan solo parcialmente. Los compuestos antimicrobianos en las plantas están comúnmente contenidos en la fracción del aceite esencial de las hojas (romero, salvia), flores y brotes de flores (clavo), bulbos (cebolla, ajo), rizomas (asafétida), frutas (pimiento, cardamomo) u otras partes de la planta. (Acero, 2011)

#### 4.7.2. ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS

El empleo de agentes químicos que ejercen actividad antimicrobiana bien sea al inhibir y/o reducir el crecimiento microbiano o por inactivación de microorganismos indeseables es una de las más antiguas y tradicionales. (Acero, 2011).

Algunas sustancias procedente de procedimientos sintéticos como el ácido sórbico y sus derivados, los sorbatos de sodio, calcio o potasio (del E-200 al E-203) se encuentran presentes en fuentes naturales por lo cual el organismo

humano es capaz de metabolizarlas sin que se produzcan acumulaciones, ni generar subproductos tóxicos, por lo cual los conservantes resultan más inocuos; en el caso de los benzoatos son poco abundantes en la naturaleza y en los alimentos, por lo que se encuentran con dificultad en la cadena metabólica de los seres vivos, siendo relativamente fácil que puedan ocasionar problemas desconocidos.

Los dos tipos de conservantes, sorbatos y benzoatos son equivalentes en cuanto a su utilización, pero la mayoría de los consumidores no conocen esta diferencia y es por esto que son utilizados ambos grupos según la mayor o menor compatibilidad del alimento (Acero, 2011).

#### **4.8. EL FIN DE LA ERA DE LOS ANTIBIÓTICOS**

Los antibióticos son verdaderamente medicamentos milagrosos. Ellos realmente curan la enfermedad. Hay muy pocos medicamentos o clases de medicamentos que pueden hacer esta afirmación. La tarea que exigimos de los antibióticos es una casi imposible. Los antibióticos son esencialmente las toxinas que se dirigen a un conjunto de los seres vivos. El logro de este, hasta el momento, ha sido sobre todo un milagro de la naturaleza. El descubrimiento de nuevos antibióticos ha sido extraordinariamente difícil. La revolución genómica, aunque sigue siendo prometedor, aún no ha avanzado este campo.

Las primeras señales de alarmarse del uso de los antibióticos se dieron cuando algunos hospitales de todo el mundo anunciaron que la vancomicina, un potente antibiótico, era incapaz de combatir el *Staphylococcus aureus*, la bacteria responsable de muchas infecciones hospitalarias; y ocurrió lo mismo con la penicilina, pues un 40 % de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Algunas cepas de *enterococcus* (capaces de provocar graves infecciones del tracto urinario y las válvulas cardíacas) que se han vuelto resistentes a todos los fármacos existentes en el mercado.

Esta situación plantea la desconcertante posibilidad de que llegará un momento en que los antibióticos, como sistema terapéutico, tendrán interés desde un punto de vista histórico”, ha advertido el doctor Stuart Levy, experto de fama mundial sobre la resistencia a las bacterias. Ya quedan incluso lejos los tiempos en que gracias a las investigaciones de Alexander Fleming, E.B. Chain y Howard Walter Florey, dispusimos del primer antibiótico de la historia, la penicilina. Se creyó entonces que aquello supondría el fin de las infecciones y de muchas epidemias. Ya lo había advertido Fleming en 1945: “El uso indiscriminado de la penicilina acabará provocando el desarrollo inevitable de bacterias resistentes”. Así pues, cualquier intento de destruirlas está destinado a fracasar tarde o temprano, porque además, según señala el doctor Jeffrey Fisher, “las bacterias producen una nueva generación cada 20 min, y se multiplican 500 000 veces más de prisa que nosotros” (Cabrera, Fadrugas y Guerrero, 2005).

#### **4.9. BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS**

Las ETA, constituyen el problema de salud pública más extendido en el mundo, El seguimiento epidemiológico de las enfermedades transmitidas por alimentos en el 2008 en Colombia resultó en la notificación al sistema nacional de vigilancia con 9.634 casos implicados en 693 brotes, mientras que en el 2007 solo se notificaron 4.929 casos, (Ministerio Nacional de Salud Colombia, 2010).

Las bacterias son los microorganismos que mejor se multiplican en los alimentos y que más enfermedades alimentarias producen. El 90% de las intoxicaciones alimentarias son originadas por bacterias, debido a su capacidad de reproducción (en 10 horas una sola bacteria, y en condiciones favorables de nutrientes, temperatura, etc., pueden convertirse en 30 millones). Algunas bacterias pueden formar esporas, que son formas de resistencia frente a productos químicos, deshidratación y calor. Posteriormente, cuando las

condiciones vuelven a ser favorables, germinan de nuevo para dar lugar a la forma vegetativa.

Algunos ejemplos de bacterias que transmiten enfermedades por medio de los alimentos son la *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (Armada y Ros, 2007).

Existen muchos investigadores que han trabajado en la evaluación y posible aplicación de compuestos bioactivos (antimicrobianos y antioxidantes), presentes en plantas, en el anexo 2 se describe informaron fuentes de antimicrobianos naturales en la planta (Tajkarimi, Ibrahim y Cliver O, 2010).

Generalmente, las bacterias Gram-negativas son menos sensibles a los antimicrobianos debido a la membrana externa de lipopolisacáridos de este grupo, que restringe la difusión de compuestos hidrófobos. Sin embargo, esto no significa que las bacterias Gram-positivas son siempre más susceptibles. Las bacterias Gram-negativas son generalmente más resistentes a los antimicrobianos de origen vegetal e incluso muestran ningún efecto, frente a las bacterias Gram-positivas (Tajkarimi, Ibrahim y Cliver O., 2010).

#### **4.10. THEOBROMA CACAO L. (CACAO):**

El árbol de cacao o cacaotero (*Theobroma cacao. L*) es una planta de la familia *Sterculiaceae* (Cuadro 1), cultivada en la franja geográfica tropical y que se extiende unos 20° de latitud en ambos hemisferios. En Colombia, se cultivan tres grandes grupos: criollo, trinitario y forastero. Esta última es una variedad de mayor expansión, debido a la facilidad para su cultivo y manejo. Las plantaciones comerciales colombianas permanente, tienen un ciclo de duración de casi cuarenta años, están formadas por arbustos de dos a tres metros que se cultivan bajo árboles más grandes como el cedro, el bucare, el mango, o el plátano, entre otros, normalmente la planta tiene entre 10 y 15

frutos, aunque en algunas ocasiones puede llegar a 20. El fruto del cacao, tiene tamaño promedio de 20 cm. de largo por 10 cm de ancho y un peso aproximado de 400 a 500 g, en su interior se encuentran las semillas, base de la elaboración del chocolate (figura 1) (AGROCADENAS, 2005).

#### **4.10.1. Clasificación Botánica.**

Para conocer el origen de cualquier cultivo, es importante tener de referencia la siguiente información

Cuadro 1. Clasificación botánica.

**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Orden:** Malvales  
**Familia:** Sterculiaceae  
**Género:** *Theobroma*  
**Especie:** *cacao L*

En el cuadro anterior, se puede observar el origen que tiene el cacao que se utilizó como referencia para desarrollar este PFG.

Tal y como se comentó anteriormente, cada parte de este material cumple una función específica en su aprovechamiento nutricional, orgánico y de producción de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana y antioxidante, entre otras



Fuente: [www.zipcodezoo/Key/Plantae/Theobroma\\_Genus.asp](http://www.zipcodezoo/Key/Plantae/Theobroma_Genus.asp)

### **Figura 1. Fruto de Theobroma cacao**

En la figura anterior, se pueden observar las diferentes partes que conforman el fruto del cacao.

#### **4.10.2. TIPOS DE CACAO CULTIVADOS EN COLOMBIA**

##### **4.10.2.1. FORASTERO O CACAO AMARGO**

Originario de América es la raza más cultivada en las regiones cacaoteras de África y Brasil. Se caracteriza por sus frutos de cascara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa y de granos aplanados de color morado y sabor amargo. Dentro de esta raza destacan distintas formas como Cundeamor, Amelonado, Sambito, Calabacillo y Angoleta. El interior de las almendras es purpura. De este tipo se obtiene un chocolate con sabor básico de cacao. (Paredes, 2005; Martínez et al., 2005)

##### **4.10.2.2. CACAO CRIOLLO O CACAO DULCE**

Este tipo de cacao se caracteriza por tener mazorcas de coloración verde y rojiza en estado inmaduro, tornándose amarillas y anaranjado – rojizas cuando están maduras. Se caracteriza por sus frutos de cascara suave y semillas redondas, de color blanco a violeta, dulces y de sabor agradable. La superficie del fruto posee diez surcos longitudinales marcados, cinco de los cuales son

más profundos que los que alternan con ellos. Los lomos son prominentes, verrugosos e irregulares. De este tipo de cacao se obtiene los chocolates más apetecidos en el mundo especialmente por sus sabores a nueces y frutas. (Paredes, 2005; Martínez et al., 2005)

#### 4.10.2.3. TRINITARIO

Se formó de manera espontánea de un cruce entre cacaos criollos y forasteros amazónicos en la isla de Trinidad (de ahí deriva su nombre). De este cruce heterogéneo se presentan diversidad de formas intermedias de mazorcas, lo mismo que la coloración, pudiéndose hallar tonos verdes y rojizos, inclusive una mezcla de ambos. El color interno del cotiledón es morado. La calidad que se obtiene de este cacao varia, pues el cultivado en Trinidad se considera fino, mientras que el cultivado en África se considera cacao corriente. (Paredes, 2005; Martínez et al., 2005).

#### 4.10.3. PRODUCCIÓN DE CACAO.

##### 4.10.3.1. EN EL MUNDO

**Cuadro 2.** Producción de cacao a nivel mundial.

	EFECTIVA		PREVISTA	TASAS DE CRECIMIENTO	
	<i>Miles de toneladas (Mton)</i>			<i>por ciento anual</i>	
	Promedio	Promedio	2010	1988-90 a 1998-2000	1998-2000 a 2010
<b>MUNDO</b>	<b>2 460</b>	<b>2 905</b>	<b>3 700</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>
<b>EN DESARROLLO</b>	<b>2 460</b>	<b>2 905</b>	<b>3 700</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>
<b>ÁFRICA</b>	1 414	1 999	2 500	3,5	2,1
Camerún	123	125	129	0,2	0,3
Costa de Marfil	793	1 249	1 610	4,6	2,3
Ghana	296	410	490	3,3	1,6

Nigeria	160	181	212	1,2	1,4
Otros	42	34	59	-2,1	5,1
<b>AMÉRICA LATINA Y CARIBE</b>	<b>629</b>	<b>397</b>	<b>520</b>	<b>-4,5</b>	<b>-2,5</b>
Brasil	347	141	180	-8,6	2,2
Colombia	51	38	39	-2,9	-3,1
Rep. Dominicana	48	36	44	-2,8	1,8
Ecuador	95	86	94	-1	0,8
México	43	35	37	-2	0,5
Otros	45	61	138	3,1	7,7
<b>LEJANO ORIENTE</b>	<b>417</b>	<b>509</b>	<b>680</b>	<b>2</b>	<b>2,7</b>
Indonesia	118	395	574	12,8	3,5
Malasia	230	52	43	-13,8	-1,7
Nueva Guinea	41	40	45	-0,2	1,1
Otros	28	22	18	-2,4	-1,8

Fuente: FAO, 2013.

En el cuadro anterior, se puede observar que los principales productores de cacao en el mundo son los países africanos, encontrándose Costa de Marfil con la mayor producción, con 1610 miles de toneladas y una tasa de crecimiento positiva del 2,3% anual.

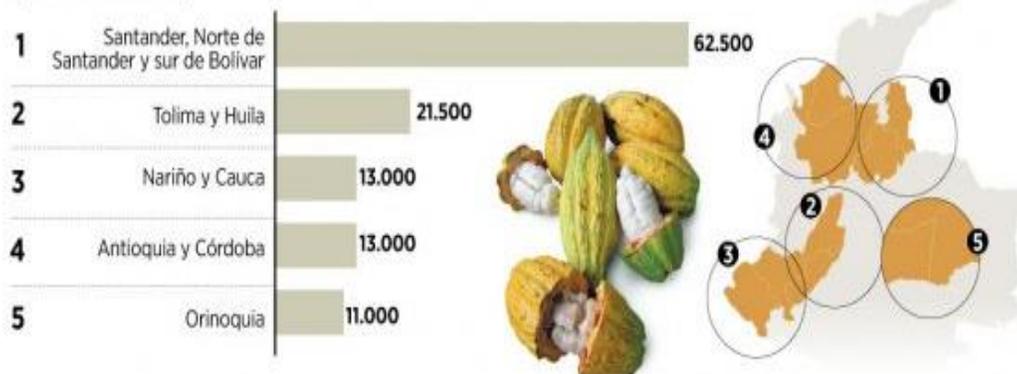
En América Latina y el Caribe la tendencia de crecimiento es negativa 2,5%, siendo Brasil (180 000 ton) el mayor productor, seguido de Ecuador (94 000 ton), la República Dominicana (47 000 ton) y México (44 000 ton), ocupando Colombia, la cuarta posición Colombia (27 000 ton) en el año 2010, (Ver Cuadro 2.)

#### **4.10.3.2. EN COLOMBIA**

Según las estadísticas de la FAO (Faostat, 2013) la producción de cacao en Colombia para el año 2011, fue de 44.241 ton, con un área cosechada de 99.205 Ha y un rendimiento 0,446 kg/Ha.

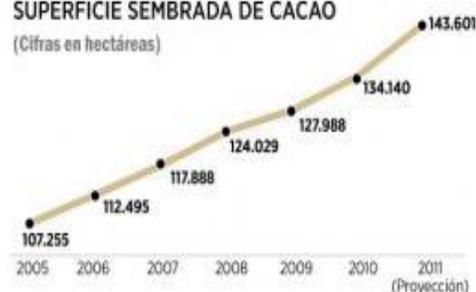
## Regiones productoras de cacao en Colombia

(Cifras en hectáreas)



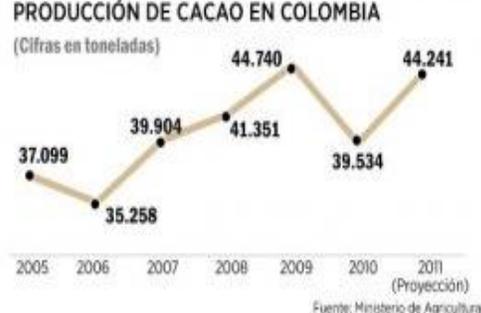
### SUPERFICIE SEMBRADA DE CACAO

(Cifras en hectáreas)



### PRODUCCIÓN DE CACAO EN COLOMBIA

(Cifras en toneladas)



Fuente: **Ministerio de Agricultura**

**Figura N° 2.** Regiones productoras de cacao en Colombia,

En la figura anterior, se puede observar que las principales regiones productoras en el país son: Santander, Norte de Santander y Sur de Bolívar, seguidos de Tolima y Huila, Nariño y Cauca, Antioquia y Córdoba y finalizando con la Orinoquia (ver figura 2). En la Cuadro 3 y 4 se describe la dinámica de producción en Colombia y Córdoba.

**Cuadro 3.** Producciones de cacao en Colombia.

Año.	Área cosechada (Ha)	Rendimiento (kg/Ha)	Producción (ton)
2008	90.959	0,4919	44.740
2009	95.167	0,4701	44.740
2010	95.641	0,4134	39.534
2011	99.205	0,446	44.241

Fuente: Faostat, 2013.

En el cuadro anterior, se puede observar la dinámica de producción, rendimiento y área cosechada el país, la cual muestra una tendencia estable con un leve decrecimiento en el año 2011.

#### 4.10.3.3. EN CÓRDOBA

En lo que respecta a producción de cacao en Córdoba, se cuenta con la siguiente información:

**Cuadro N°4.** Producción de cacao en Córdoba.

Valores					
Cultivo	MUNICIPIO	Rendimiento (ton/ha)	Suma de Área Sembrada (ha)	Suma de Área Cosechada (ha)	Suma de Producción (ton)
CACAO	LOS CORDOBAS	1	214	123	123
	MONTELIBANO	0,5	169	15	8
	VALENCIA	0,9	686	171	154
	CIENAGA DE ORO	0,8	17	15	12
	MONTERIA	0,6	14	13	8
	PUEBLO NUEVO	0,6	8	2	1
	PUERTO ESCONDIDO	0,7	27	14	10
	SAN PELAYO	0,667	4	3	2
	PUERTO LIBERTADOR	0,65	173	35	23
	CANALETE	0,73	50	30	22
	TIERRALTA	0,692	2.414	650	450
	SAN JOSE DE URE	0,7	66	10	7
<b>Total general</b>			<b>3.842</b>	<b>1.081</b>	<b>819</b>

**Fuente:** Secretaría de desarrollo, Gobernación de Córdoba 2013.

Del cuadro anterior, se puede decir que Córdoba tiene una producción significativa de cacao de 3.842 ha, y además que este producto se encuentra incluido dentro de las apuestas productivas del departamento y el país, por lo que se espera que la tendencia de producción y área cosechada aumente en los años venideros.

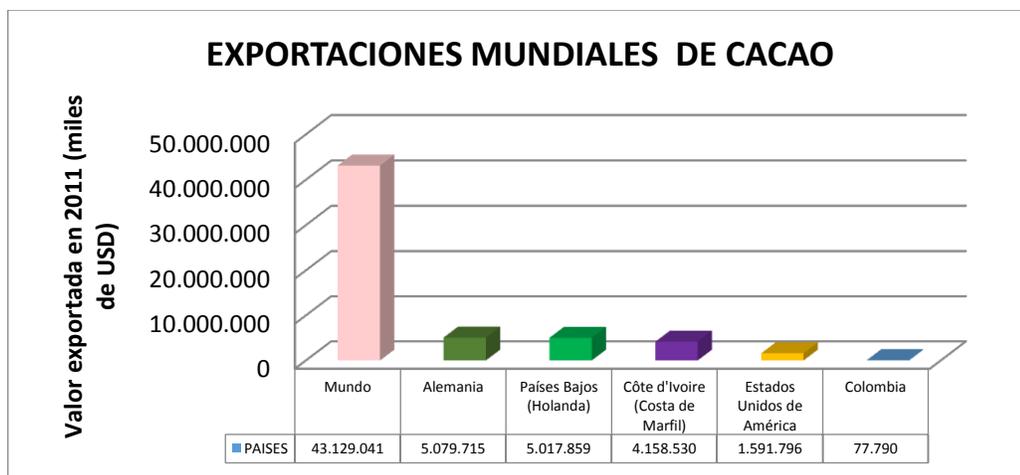
#### 4.10.4. BALANZA COMERCIAL - EXPORTACIONES DE CACAO

Los EEUU es un país netamente importador de materia prima ya que no tiene producción interna de cacao, sus exportaciones son básicamente derivadas del procesamiento de la misma. Es importante mencionar la dinámica del mercado Mundial del cacao, el cual ha tenido un crecimiento entre 2007- 2011 de 11% y en el periodo de 2010-2011 del 15% anual.

**Cuadro N° 5.** Exportaciones mundiales de cacao

<b>Cacao</b>						
N°	Exportadores	Indicadores comerciales				
		Valor exportada en 2011 (miles de USD)	Saldo comercial 2011 (miles de USD)	Tasa de crecimiento anual en valor 2007-2011 (%)	Tasa de crecimiento anual en valor 2010-2011 (%)	Participación en las exportaciones mundiales (%)
	Mundo	43.129.041	-991.279	11	15	100
1	Alemania	5.079.715	382.769	13	20	11,8
2	Países Bajos (Holanda)	5.017.859	834.761	12	10	11,6
3	Costa de Marfil	4.158.530	4.152.851	17	9	9,6
7	Estados Unidos de América	1.591.796	-3.215.255	11	15	3,7
44	Colombia	77.790	-12.389	4	8	0,2

**Fuente: TRADEMAP, 2013.**



Fuente: TRADEMAP, 2013.

**Figura 3.** Exportaciones Mundiales de Cacao.

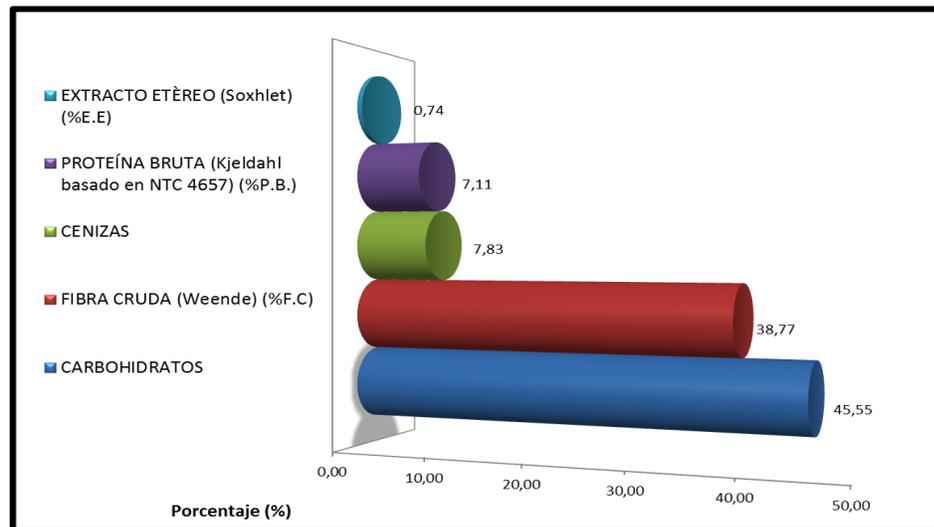
Como se muestra en la Cuadro 5 y figura 3 respectivamente, el país que mayor valor de exportación presentó para el 2011 fue Alemania, seguida de Holanda, con una diferencia porcentual de 0.2 puntos, La tasa de crecimiento anual que tuvo Alemania del 20%, está por encima del promedio mundial. Colombia ocupa para el 2011, la posición (44), con una participación en el mercado de 0,2 %, reflejado con un valor de las mismas de 77.790 (miles de USD), sin embargo su balanza comercial es negativa en 12.389 (miles de USD), lo que nos indica que es un país importador de cacao y sus derivados.

#### 4.10.5. EL CACAO COMO PLANTA ALIMENTICIA Y MEDICINAL

Desde hace más de 3000 años hasta la actualidad, el cacao se ha utilizado para tratar la anemia, la fatiga mental, tuberculosis, fiebre, gota, cálculos renales, e incluso el apetito sexual pobre, cuentan los historiadores que ya en 1519, el emperador azteca Moctezuma consideró al cacao "una bebida divina, que acumula la resistencia y combate la fatiga. Una taza de esta bebida preciosos permite a un hombre caminar por un día entero sin comer".

#### 4.10.6. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DEL LA SEMILLA Y LAS CÁSCARAS DE MAZORCA DE CACAO

Según el estudio publicado por Geney y Rios (2014) la Composición bromatológica de las cáscaras de cacao está dada de la siguiente forma (Figura 4), las cáscaras de mazorca de cacao se encuentran mayormente constituidas por carbohidratos y fibra y en menores proporciones por grasa, proteína y cenizas.



Fuente: Geney y Rios (2014)

Figura 4. Composición proximal en base seca de las cáscaras de mazorca de cacao de la variedad TSH 565 expresadas en porcentaje (%)

En la figura 4, se puede observar la composición proximal en base seca de las cáscaras de mazorca de cacao, de la variedad TSH 565 expresadas en porcentaje (%), siendo el contenido de carbohidratos el compuesto encontrado en mayor proporción, seguido de la fibra, cenizas, proteína bruta y extracto etéreo.

Varios efectos en la salud, incluyendo la función mejorada del corazón, el alivio de la angina de pecho, estimulación del sistema nervioso, la digestión facilitado,

y la mejora de la función del riñón y el intestino han sido considerados para su uso medicinal. La investigación reciente en la población indígena Kuna de Panamá reveló que los indios Kuna viven en las islas, grandes consumidores de cacao, tuvieron tasas significativamente más bajas de enfermedades del corazón, el cáncer y la diabetes mellitus en comparación con los del continente, que no consumen cacao, lo que sugiere que el cacao podría ser útil en la prevención de la enfermedad cardíaca, el cáncer y la diabetes mellitus (Kim, Won Lee y Lee., 2011).

Han pasado 15 años desde la primera mención en una revista médica que el cacao es una fuente potencial de antioxidantes. Se ha encontrado que la cocoa, tiene una mayor capacidad antioxidante por porción que un té y un vino tinto. Los fitoquímicos de cacao, tienen una fuerte actividad anti-inflamatoria y los fotoquímicos seleccionados presentes en el cacao, se han utilizado como agentes quimiopreventivos en la tumorigénesis, el crecimiento tumoral, y la angiogénesis. (Kim, Won Lee y Lee., 2011).

El consumo de cacao rico en polifenoles, ejerce efectos beneficiosos sobre la presión arterial flujo sanguíneo a los tejidos cutáneos y subcutáneos y sanguíneo cerebral, por lo que se ha sugerido al cacao como un posible tratamiento para la demencia y para mejorar la apariencia y textura de la piel (Kim, Won Lee y Lee., 2011).

#### **4.10.7. VALOR NUTRICIONAL DE LAS SEMILLAS DEL CACAO.**

El chocolate es un producto obtenido a partir de granos de cacao. En la formulación de chocolate, los ingredientes clave son: sólidos de cacao, manteca de cacao, azúcar y lecitina como emulsionante. El Chocolate y productos de chocolate se caracterizan por ser productos con alta energía y densidad nutricional. La composición nutricional de Chocolate corresponde a su alto contenido en hidratos de carbono y las grasas. Los hidratos de carbono, están representados principalmente como azúcares con un contenido total de hasta

45%, y la grasa, con un contenido total de hasta 30%. El chocolate también contiene minerales, especialmente potasio, magnesio, cobre y hierro (USDA, Base de Datos Nacional de Nutrientes para Referencia Estándar, 2010).

Productos a base de cacao, tienen alto valor energético en relación con su volumen. Contienen una proporción de hidratos de carbono y proteínas, junto con las vitaminas del complejo B. El chocolate con leche también contiene proteínas de la leche, calcio y otros minerales. El chocolate negro contiene 64,8 por ciento de hidratos de carbono, 29,2 por ciento de grasa, 4,7 por ciento de proteína, sodio (Na), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), y en la proporción de 11, 300, 38, 100, y 140 mg por 100 g, respectivamente . Una barra de chocolate de 100 g tiene una energía equivalente a 500 calorías. Contiene teobromina y la cafeína, que son responsables de los efectos estimulantes. El chocolate tiene una producción de energía, y el efecto restaurador, tónico sobre el cuerpo. Algunos estudios indican que el chocolate normal tiene un contenido de colesterol de 1 mg / 100 g y por lo tanto sólo desempeña un papel muy insignificante en el consumo de colesterol. Sin embargo, el consumo de chocolate debe ser evitado por los diabéticos (Torres M. Torres C. Salas y Blanch 2014).

El cacao es rico en polifenoles, los cuales pueden jugar un papel en la prevención de ciertas enfermedades. Estudios en animales y humanos han demostrado algunos efectos beneficiosos de los polifenoles de cacao sobre la función endotelial, la oxidación de las lipoproteínas y las plaquetas, así como la inflamación y la sensibilidad a la insulina, más probablemente el resultado de sus fuertes propiedades antioxidantes. El chocolate contiene unas 300 sustancias químicas, lo que dificulta que pueda hacerse una clasificación con exactitud. Varios estudios avalan las características beneficiosas de este producto, siempre y cuando su consumo no sea excesivo. (Torres M. Torres C. Salas y Blanch 2014).

#### 4.10.8. POLIFENOLES PRESENTES EN CACAO

Los polifenoles, son compuestos bioactivos naturales que se encuentran en frutas y verduras. Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que hay una estrecha relación entre el consumo de polifenoles y la prevención de ciertas enfermedades. Hay variaciones considerables en la absorción, el metabolismo y la biodisponibilidad de diferentes clases de polifenoles debido a sus diferencias estructurales. El Intestino humano contiene diversas poblaciones microbianas que tienen una contribución importante en el metabolismo de los polifenoles y los consiguientes beneficios para la salud. Los polifenoles pueden tener efectos en la salud terapéuticos para una variedad de condiciones patológicas crónicas incluyendo cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, y enfermedades cardiovasculares. Muchos polifenoles se derivan de los productos alimenticios naturales.

Por lo tanto, a menudo se consideran más seguros y más fácilmente integrados en los cambios de estilo de vida que las drogas farmacéuticas convencionales. Recientemente, se han descubierto muchas moléculas específicas para diversos polifenoles.(Gulcin, Reza y Marotta, 2013). El cacao ha sido identificado como un alimento con un alto contenido de polifenoles. Los granos de cacao contiene 4 tipos de catequinas, de las cuales la (-)-epicatequina constituye el 92% del total de las mismas. El color café y morado en los granos de cacao se atribuye a los productos de una alteración compleja entre catequinas y taninos. El estudio de polifenoles en el cacao se extendió con el descubrimiento de importantes polifenoles de bajo peso molecular tales como catequina, epicatequina (Anexo 3), dímeros como epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina (procianidina B1), epicatequina-(4 $\beta$ →8)- epicatequina (procianidina B2) y trimeros (Anexo 4) [epicatequina- (4 $\beta$ →8)<sup>2</sup>- epicatequina (procianidina C1), (Richelle et al., 2001; Rawel y Kulling, 2007). Estudios previos muestran que los polifenoles monoméricos, tales como catequina y epicatequina, dímeros, trímeros y tetrámeros se separaron e identificaron mediante

cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y cromatografía de gases – espectrometría de masas.

La epicatequina es el componente predominante en el cacao con una proporción de 11:1 comparada con la catequina. La (+)-catequina y (-)-epicatequina son las formas más comunes encontradas en el cacao. Sin embargo, sus respectivos enantiómeros, tales como la (-)-catequina y la (+)-epicatequina (ver Anexo 5) no son comúnmente encontrados en la naturaleza. Otros polifenoles en menores proporciones se han identificado en el cacao tales como quercetina, isoquercitrina (quercetina 3-O-glucosido), hiperosida (quercetina 3-O-galactosido), naringenina, luteolina, y apigenina (Anexo 6) (Martin et al, 2008). La estructura química de los flavanoles y procianidinas es importante, (Jalil e Ismail, 2008). También se ha descrito que la catequina, epicatequina y quercetina reducen el riesgo de mortalidad por enfermedades coronarias, (Paredes y Clemente., 2005).

#### **4.10.9. MÉTODOS PARA OBTENER COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN ALIMENTOS**

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuoso-orgánicos. La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del método de extracción (polaridad de los solventes), del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia. A veces se requieren pasos adicionales o previos a la extracción para eliminar sustancias no deseadas que pueden interferir en nuestros análisis (grasa, carbohidratos, clorofilas) normalmente mediante extracción en fase sólida (Robins, 2009).

Hasta el momento no hay un único procedimiento estándar y adecuado para la extracción de todos los compuestos polifenólicos o de las diferentes clases de

polifenoles. La mayor parte de estudios sobre extracción de polifenoles de matrices alimentarias están basados en la utilización de mezclas de disolventes, generalmente acuoso-orgánicos con pH ácidos para una mayor resolución en la caracterización y una mayor estabilidad de determinados compuestos (Arranz, 2010).

#### **4.11. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENOLES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTES.**

La importancia del análisis de los compuestos polifenólicos en los alimentos radica, no sólo, en encontrar el mejor método de extracción sino también en la cuantificación e identificación completa y precisa de estos compuestos. Para ello existen numerosos métodos espectrofotométricos con los se pueden cuantificar desde polifenoles totales hasta determinados grupos de compuestos (Arranz, 2010). Entre estos métodos se encuentran el método de Folin Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales (Singleton et al., 1998) y el método de la vainillina para determinación de proantocianidinas (Okuda et al., 1989). Sin embargo, a pesar de los intentos por desarrollar métodos sencillos de cuantificación en UV-VIS, la absorción de los compuestos polifenólicos se ve afectada por la naturaleza de los disolventes, el pH de los extractos y por otros compuestos que absorben en UV-VIS y que actúan como interferentes (grasas, vitaminas, aminoácidos).

De esta manera en los últimos años la mayoría de los trabajos sobre análisis de polifenoles se basan en la utilización de métodos cromatográficos, entre ellos , la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) o electroforesis capilar (EC) acoplados muchas veces a espectrometría de masas (MS). Las técnicas de HPLC son las más habituales para separar y cuantificar polifenoles (Georgé et al., 2005).

Sin embargo, la cuantificación de taninos condensados o proantocianidinas de alto peso molecular y polifenoles hidrolizables, principales compuestos polifenólicos presentes en los residuos de extracción, se ha basado hasta ahora en la utilización de métodos espectrofotométricos. Así, los polifenoles hidrolizables extraídos por metanólisis son cuantificados por Folin Ciocalteu a 750 nm frente a curvas de calibrado de ácido gálico, cafeico o algún ácido benzoico similar dependiendo de la muestra (Hartzfeld et al., 2002).

#### 4.12. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

Se ha demostrado que los efectos antimicrobianos de los extractos de plantas causan daños estructurales y funcionales en la membrana celular bacteriana. También se indica que el rango óptimo de hidrofobicidad está involucrado en la toxicidad de las organizaciones de empleadores. Especies y hierbas se utilizan sobre todo en el rango de 0,05-0,1% (500-1000 ppm) en los sistemas alimentarios. Algunas especias tienen fuerte actividad antimicrobiana que otros y pueden ser eficaces a 1000 ppm. Sin embargo, algunas especias requieren concentraciones más altas. Existen diferentes métodos de exposición, como fase de vapor, método de contacto directo. La estereoquímica, lipofilia y otros factores afectan la actividad biológica de estos compuestos que podrían ser alterados positiva o negativamente por ligeras modificaciones. Se ha demostrado que las sustancias de las plantas afectan a las células microbianas por diversos mecanismos antimicrobianos, incluyendo atacar a la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, lo que altera los sistemas enzimáticos, compromete el material genético de las bacterias, formando la ácido graso hidroperoxidasa, que causa la oxigenación de ácidos grasos insaturados.

La eficacia antimicrobiana aparente de antimicrobianos de origen vegetal depende de factores tales como el método de extracción, material vegetal, el volumen de inóculo, fase de crecimiento, el medio de cultivo utilizado, y las

propiedades intrínsecas o extrínsecas de la comida tales como el pH, grasas, proteínas, contenido de agua, antioxidantes, conservantes, tiempo de incubación/ temperatura, el procedimiento de embalaje, y la estructura física de los alimentos (Tajkarimi , Ibrahim y Cliver , 2010).

A continuación se presenta una breve descripción de los diferentes métodos empleados para la determinación de la capacidad antioxidante de un producto

**El ensayo ORAC.** Se basa en la generación de radicales hidrófilos piróxilo ( $\text{ROO}^*$ ) por la descomposición térmica del compuesto diazo AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), estos radicales oxidan el sustrato fluorescente fluoresceína (FL) causando una extinción de su fluorescencia. Por lo tanto, la inhibición de este proceso por un antioxidante es una medida de su capacidad para reducir la producción de ROO.

**Método de ABTS.** Este ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 415 o 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin -6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio.(Guerrero et al., 2000; García et al., 2004; Rodríguez, 2006; Rojano et al., 2008).Este método fue adaptado del método descrito por Leighton, F, Urquiaga, I. y Diez, M., (1997) para un volumen de 3 mL. Las mediciones de absorbancia se realizan a una longitud de onda de 732 nm empleando un espectrofotómetro (Génesis 20). El radical ABTS se genera por la reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) (3,5 mM) con per sulfato de potasio (1,25 mM). Después de 16 h de reacción, se diluye el reactivo ABTS concentrado con solución buffer fosfato a pH 7,4 hasta absorbancia  $0,70 \pm 0,01$ , a una longitud de onda de 732 nm. Para la evaluación se emplean 150  $\mu\text{L}$  del extracto diluido y 2850  $\mu\text{L}$  de la solución del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , luego de 7 min de reacción a temperatura ambiente y oscuridad, se lee el cambio en la absorbancia de la muestra, se mide también el blanco (Buffer) y la referencia

(Solvente) en iguales condiciones. Los resultados se expresaron  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ . (Martínez 2009).

**Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).** El análisis de FRAP se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , formando un complejo azul leído a una absorción alta a una longitud de onda de 716 nm (García et al., 2004; Márquez, 2006; Martínez, 2007).

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1. EXPERIMENTO 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL CACAO.**

#### **5.1.1. INTRODUCCIÓN**

El deterioro de los alimentos se puede producir a partir de sus materias primas, la transformación y la distribución. Algunas fuentes que pueden causarlo son las químicas, físicas y microbiológicas. Las técnicas de conservación utilizadas para prevenir que éste se genere, se han mejorado mucho en los últimos años, con el fin de lograr reducir al mínimo cualquier crecimiento de microorganismos, incluidos los patógenos. Agentes antimicrobianos naturales derivados de fuentes tales como aceites de plantas, han sido reconocidos y utilizados durante siglos en la conservación de alimentos. Las especias fueron utilizadas por los antiguos egipcios y se han utilizado durante siglos en los países asiáticos como China y la India. Algunas de las especias, tales como el clavo de olor, la canela, la mostaza, el ajo, el jengibre y la menta, todavía se aplican como remedios alternativos de salud en la India, dicha producción se remonta a más de 2000 años para el Lejano Oriente, con los inicios de las tecnologías más modernas que ocurren en Arabia en el siglo noveno.

Sin embargo, fue también durante este período de tiempo que las aplicaciones médicas de las organizaciones de empleadores se convirtieron secundaria a su

uso para el sabor y el aroma. Los extractos de plantas y especias, además de contribuir al gusto y sabor, puede actuar en contra de los patógenos Gram-positivos tales como *L.monocytogenes*. (Tajkarimi, Ibrahim y, Cliver O. 2010).

El objetivo de este trabajo final de graduación (PFG), consiste en establecer un método de extracción de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de subproductos del cacao.

## **5.1.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.2.1. Materiales**

La materia prima empleada para la realización de la presente investigación será cáscara de mazorca de cacao (*Theobroma cacao L*) de la variedad TSH 565, proveniente la parcela “Los Campanos” de la vereda San Clemente, municipio de Tierralta, departamento de Córdoba Colombia.

### **5.1.2.2. Recolección de la materia prima.**

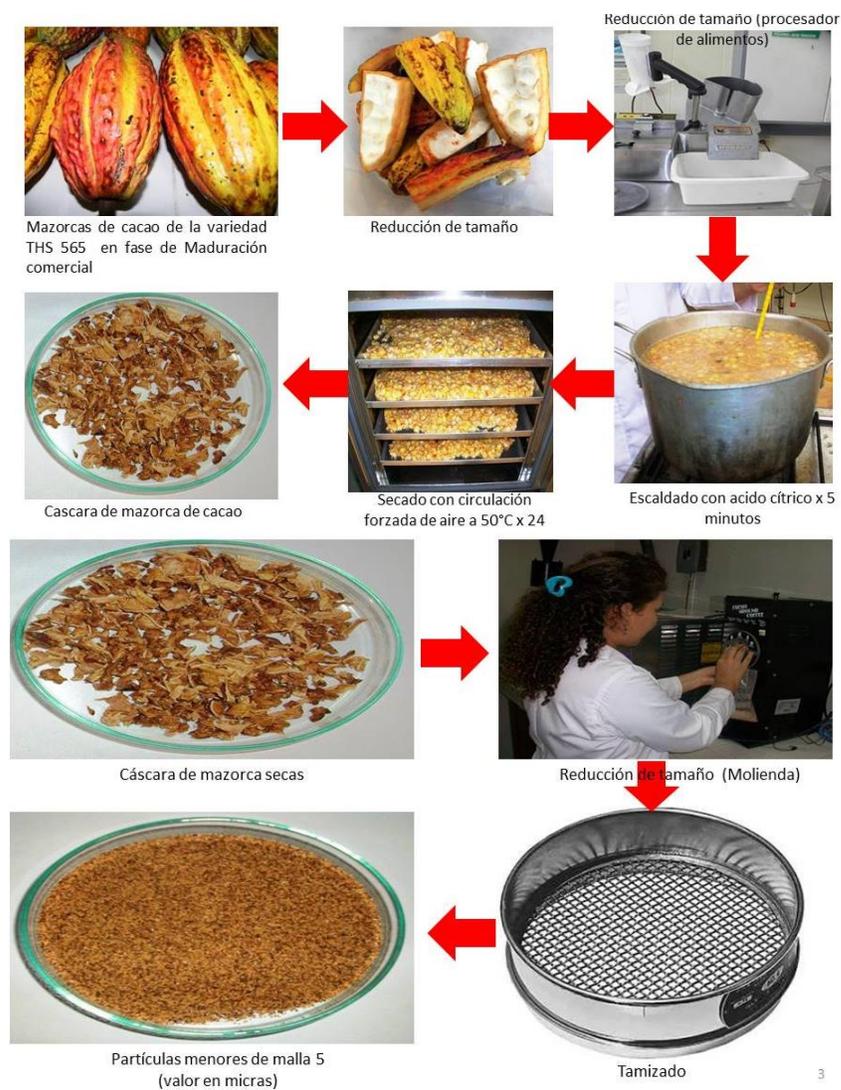
La recolección se realizó en cultivos de cacao, en la finca Los Campanos ubicada en la vereda San Clemente del municipio de Tierralta, Departamento de Córdoba. Las muestras de cacao se tomaron en la fase de maduración comercial.

### **5.1.2.3. Adecuación de la materia prima.**

El fruto del cacao se cortó en dos partes separando las semillas de las cáscaras, estas últimas se redujeron de tamaño con un procesador de vegetales (cubos de 1 cm de largo por 1 cm de ancho y 3 mm de espesor) y luego se sumergieron en una solución de ácido cítrico al 1%, para

posteriormente pasarlo al proceso de escaldado durante 5 minutos a una temperatura de  $75^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

Posteriormente, las muestras se llevaron a un proceso de secado (horno con circulación de aire PALLOMARO o de convección forzada) a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, hasta obtener una humedad de 10% aproximadamente y por último fueron sometidas a un proceso de reducción de tamaño en un molino FRESH GROUND COFFEE, obteniéndose partículas finas en un tamiz malla 5 (Martínez, 2010).



Fuente: Autoría propia.

**Figura 5.** Adecuación de la materia prima para análisis experimentales

En la figura 5, se ilustra el proceso de adecuación de la materia prima, previo a al proceso de cosecha, recolección y transporte del cacao.

#### **5.1.2.4. Obtención de los extractos.**

En frascos de vidrio color ámbar, se depositaron 10 g de muestra seca, molida y tamizada y 100 mL de la solución extractora, para cada caso (relación 1:10 muestra: solución de extracción).

Las mezclas pasaron por un proceso de agitación continua en una mesa agitadora TECNAL modelo TE-1401 con 6 horas de extracción estableciendo para cada caso, a una velocidad constante de 200 rpm, las cuales posteriormente se filtraron, recogiendo el sobrenadante en frascos de vidrio color ámbar.

Las soluciones extractoras son una mezcla etanol: agua etanol: agua 50:50, las que luego se filtraron con ayuda de papel filtro y se concentraron en un evaporador rotatorio hasta la eliminación de los solventes de extracción. El extracto obtenido se diluyó teniendo en cuenta las concentraciones de estudio



Fuente: Autoría propia.

Figura 6. Obtención de los extractos de cáscara de mazorca de cacao.

En la figura anterior, se ilustra el proceso de obtención de extractos en sus diferentes presentaciones: 100%; 75:25; 50:50 y 25:75 respectivamente.

### 5.1.3. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM), se realizó por medio del método de siembra por dilución en medio líquido, utilizando 11 tubos de ensayos en los cuales se adicionó caldo Mueller Hilton y diferentes concentraciones de extracto en relación 1:1. Luego, las concentraciones de extractos se diluyeron a la mitad comenzando en el tubo uno con 200 000 ppm hasta llegar a 390. 62 ppm. Seguidamente, se adicionó el inóculo bacteriano ajustando la turbidez a 0,5 de la escala de Macfarland. Los tubos fueron incubados a 37 °C con agitación durante 20 horas. Pasado este tiempo, se observó el crecimiento de los microorganismos con el cambio de la turbidez de los tubos. Método ISO 20776 (2008).

Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB), se partió del procedimiento anterior, después de haber determinado cuales de los tubos de ensayo presentan menor crecimiento bacteriano. Se tomaron 10 microlitros de cada tubo para sembrar en el medio agar nutritivo y esto se lleva a incubación a 37°C por 24 horas para realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias.

La curva de letalidad, se realizó para verificar el efecto del tiempo y la concentración del extracto en el microorganismo, para el caso de la presente investigación basado en los resultados de la MIC se tomaron las concentraciones inmediatamente superior e inferior (según el cuadro 7), cada análisis se realizó por triplicado, en tubos de ensayo con caldo Mueller Hilton con las respectivas concentraciones de extractos. Seguidamente, se adicionó el inóculo bacteriano ajustando la turbidez a 0,5 de la escala de Macfarland. Los tubos fueron incubados a 37 °C, el crecimiento del microorganismo se monitoreó cada 2 horas por un tiempo de 24 horas.

#### **5.1.4. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado en el que las **variables independientes fueron** la concentración del extracto (200,000, 100,000, 50,000, 25,000, 12,500, 6,250, 3,125, 1,562.5, 781.25, 390.62 ppm y el tipo de microorganismo (*Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213): **mientras que las variables dependientes** fueron la capacidad inhibitoria y la bactericida.

**Cuadro 6.** Diseño experimental para determinar la concentración mínima inhibitoria

FACTORES	NIVELES (ppm)
Concentración extracto	200 000
	100 000
	50 000
	25 000
	12 500
	6 250
	3 125
	1562
	781
340	
Tipo de microorganismo	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213

Fuente: Autoría propia.

En la Cuadro 6, se muestran los niveles de los factores de concentración del extracto, tipo de extracto y de microorganismo.

### 5.1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

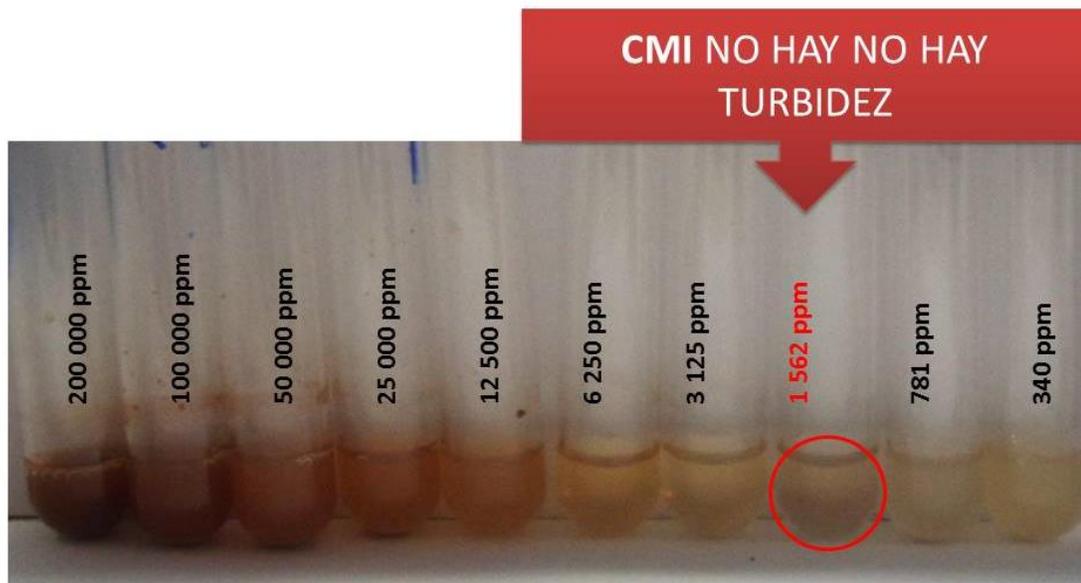
Para determinar el posible efecto bactericida del extracto de la cáscara de la mazorca del cacao se realizó la prueba de concentración inhibitoria mínima frente a un microorganismo Gram + (*Staphylococcus aureus*) y un microorganismo Gram – (*Escherichia coli*), por medio de la turbidez generada en los tubos se encontró que la concentración inhibitoria mínima para la *Staphylococcus aureus* fue de 1,152 ppm y 12,500 ppm para la *Escherichia coli*.

Cuadro 7. Concentración mínima bactericida del extracto de la cáscara de la mazorca del cacao sobre la cepa de microorganismos Gram positivo (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativo (*Escherichia coli*).

Concentración extracto (ppm)	Microorganismo	
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
200 000	-	-
100 000	-	-
50 000	-	-
25 000	+	-
12 500	+	-
6 250	+	-
3 125	+	+
1562	+	+
781	+	+
340	+	+

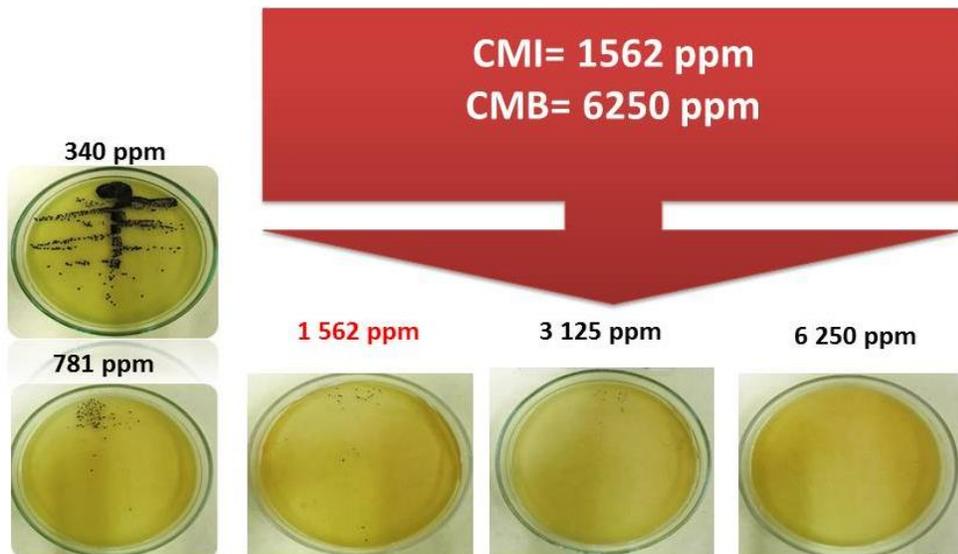
(+) Crecimiento (-) Ausencia de Crecimiento

Fuente: Autoría propia.



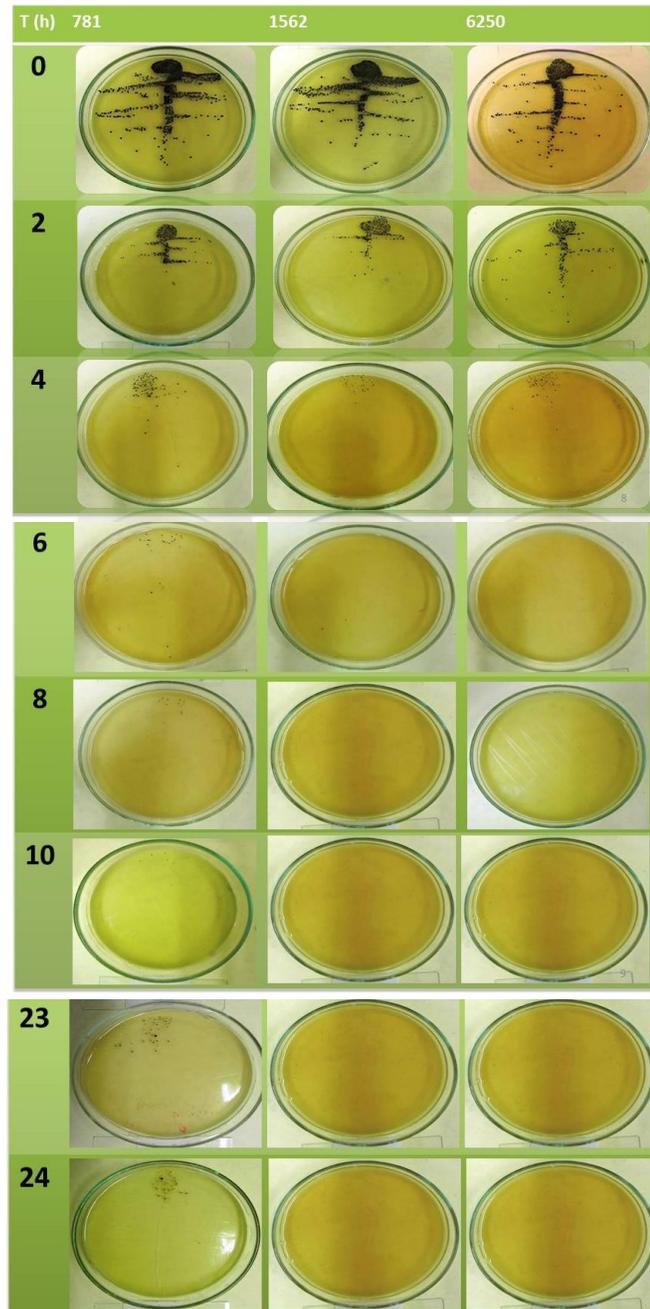
Fuente: Autoría propia.

Figura 7. CMI de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213



Fuente: Autoría propia.

Figura 8. CMB de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

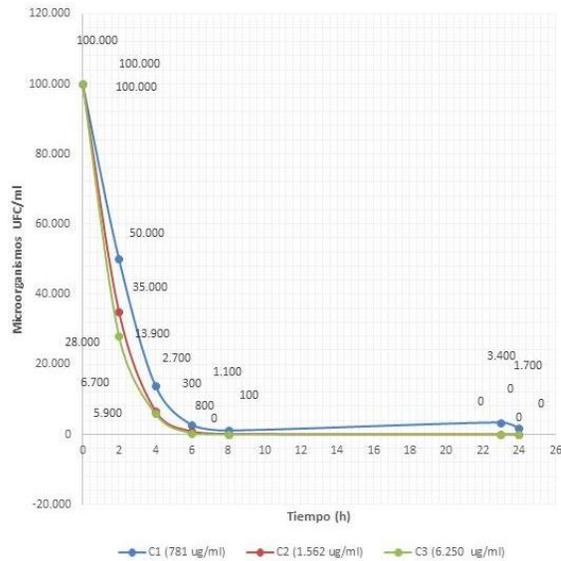


Fuente: Autoría propia.

Figura 9.a. Curva de letalidad en medios de cultivo para el ***Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

**S  
t  
a  
p  
h  
y  
l  
o  
c  
c  
o  
c  
c  
u  
s  
  
a  
u  
r  
e  
u  
s**

## Curva de Letalidad

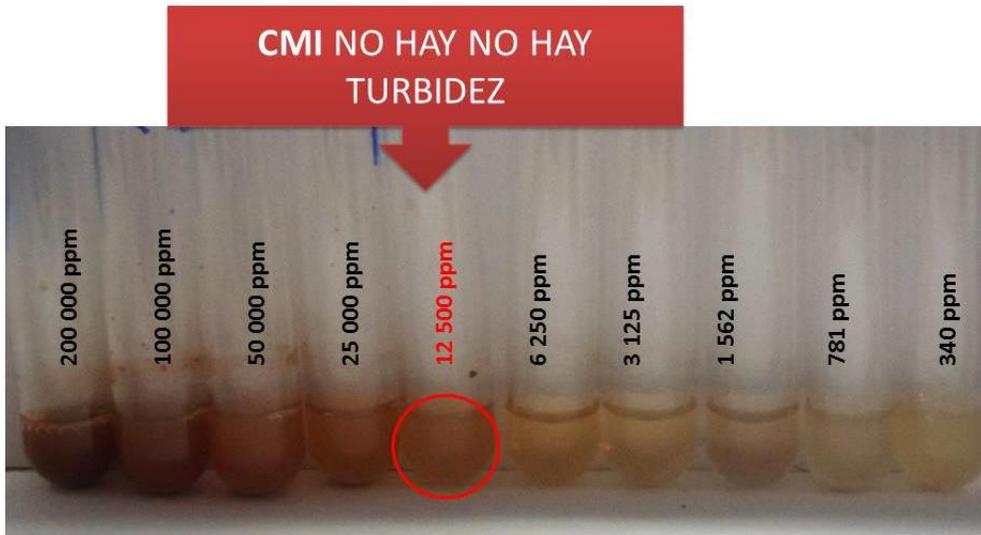


Tiempo (h)	C1 (781 ug/ml)	C2 (1.562 ug/ml)	C3 (6.250 ug/ml)
0	100.000	100.000	100.000
2	50.000	35.000	28.000
4	13.900	6.700	5.900
6	2.700	800	300
8	1.100	100	0
23	3.400	0	0
24	1.700	0	0

Tiempo (h)	Log C1 Y = log <sub>10</sub> N(t)	Log C2 Y = log <sub>10</sub> N(t)	Log C3 Y = log <sub>10</sub> N(t)
0	5,00	5,00	5,00
2	4,70	4,54	4,45
4	4,14	3,83	3,77
6	3,43	2,90	2,48
8	3,04	2,00	#¡NUM!
10	3,53	#¡NUM!	#¡NUM!
23	3,23	#¡NUM!	#¡NUM!
24	#¡NUM!	#¡NUM!	#¡NUM!

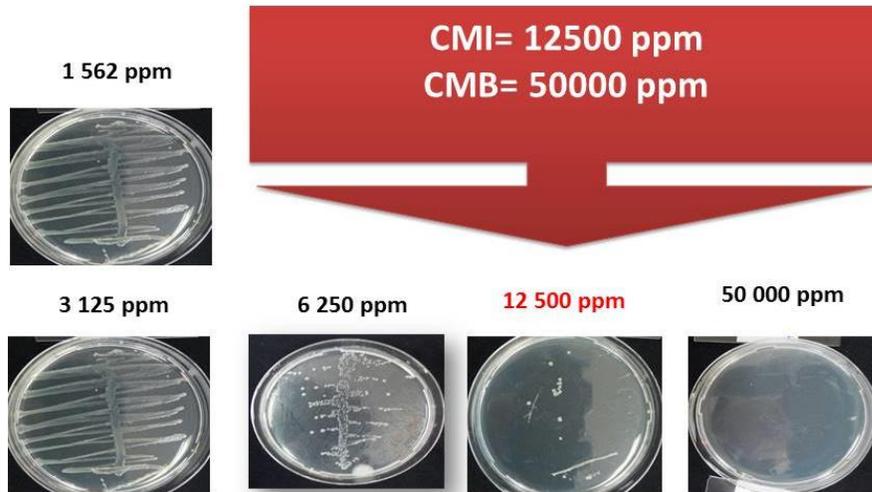
Fuente: Autoría propia.

Figura 9.b. Curva de letalidad para el **Staphylococcus aureus ATCC 29213**



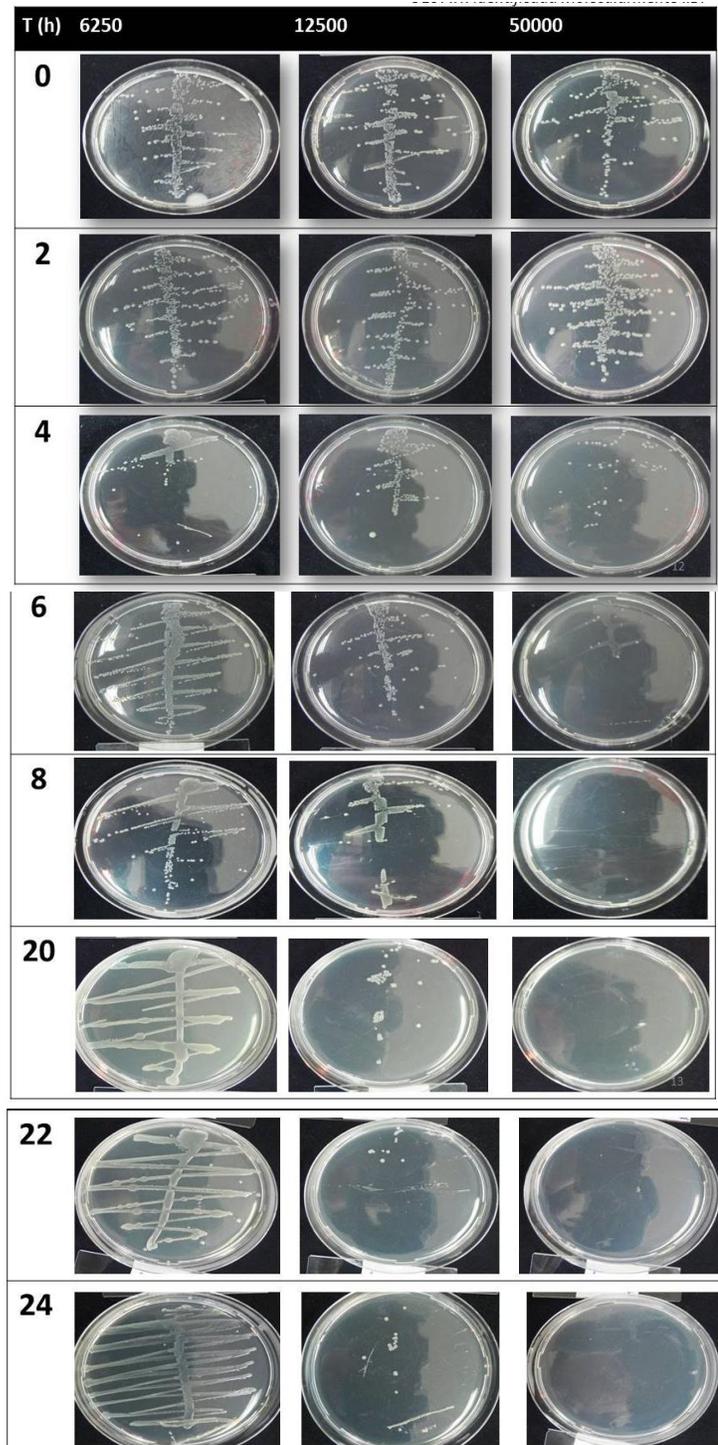
Fuente: Autoría propia.

Figura 10. CMB de **Escherichia coli O157:H7** identificada Molecularmente IIBT



Fuente: Autoría propia.

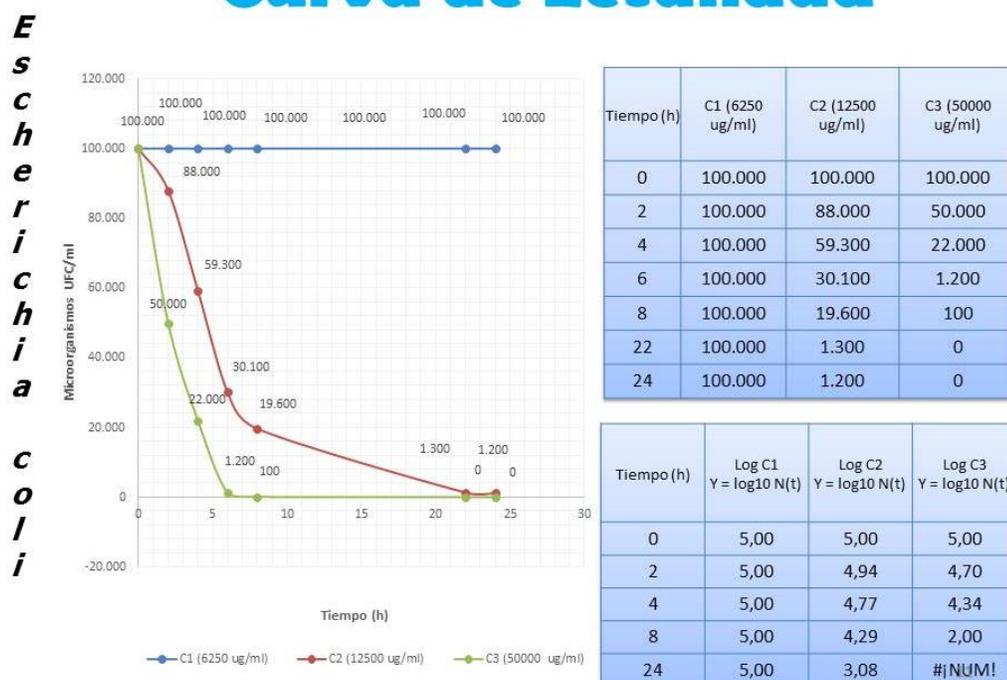
Figura 11.a. CMB de *Escherichia coli* O157:H7 identificada molecularmente IIBT.



Fuente: Autoría propia.

Figura 12.a. Curva de letalidad para la *Escherichia coli* O157:H7 identificada molecularmente IIBT, en medio de cultivo.

# Curva de Letalidad



Fuente: Autoría propia.

Figura 12.b. Curva de letalidad para la *Escherichia coli* O157:H7 identificada molecularmente IIBT.

Como se puede observar en el Cuadro 7 y en las figuras 7,8, 9a, 9b 10, 11, 12a, 12b, respectivamente, se encontró que el extracto de la cáscara de la mazorca del cacao, tiene un efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, lo cual se evidenció por la ausencia de crecimiento de estos microorganismos, a partir de la concentración de 6,250 ppm para el caso del *Staphylococcus aureus* y 50,000 ppm para *Escherichia coli*,

La actividad bactericida y bacteriostática de los compuestos obtenidos de la cáscara de mazorca de cacao, se debe en gran medida a los compuestos fenólicos, estudios han evidenciado su eficacia contra las bacterias Gram-positivas en mayor medida que contra las bacterias Gram-negativas resultado que coincide con el encontrado en la presente investigación. Generalmente, las bacterias Gram-negativas son menos sensibles a los antimicrobianos debido a

la membrana externa de lipopolisacáridos de este grupo, que restringe la difusión de compuestos hidrófobos. Sin embargo, esto no significa que las bacterias Gram-positivas son siempre más susceptibles. Las bacterias Gram-negativas son generalmente más resistentes a los antimicrobianos de origen vegetal e incluso muestran ningún efecto, frente a las bacterias Gram-positivas (Gutiérrez M., 2012).

A pesar de esto, se han realizado pocos estudios para comparar la concentración mínima antimicrobiana de compuestos fenólicos naturales definidos químicamente de forma simultánea contra varias cepas de *S. aureus*, de *B. cereus*, de *E. coli* del grupo Shigatoxigénico de *Escherichia coli* (STEC), y de *P. fluorescens* aisladas de diferentes fuentes de alimento (principalmente la leche y los productos cárnicos) y con diferentes rasgos de virulencia (*S. aureus* y STEC). Hasta la fecha, la mayoría de los estudios disponibles sobre el efecto de los compuestos fenólicos en estos microorganismos se han llevado a cabo utilizando una o dos cepas de referencia.

Sin embargo, recientemente se ha señalado que el rango en el crecimiento o inactivación características de las bacterias puede variar significativamente entre las especies y, incluso, entre cepas de la misma especie, y que los juicios sobre la seguridad de los procesos de alimentos debe tener en cuenta estas variaciones (Gutiérrez M., 2012).

Otros estudios antimicrobianos, no son directamente comparables debido a las diferencias metodológicas como la elección de mezclas de origen natural (por ejemplo, aceites esenciales) y método de ensayo antimicrobiano (Hammer et al., 1999 y Janssen et al., 1999). Para solucionar este último problema, se recomienda el uso de metodologías estandarizadas que permiten a los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación para ser comparados. En este sentido, recientemente, ISO publicó un método de referencia para ensayar la *in vitro* la actividad de los agentes antimicrobianos frente a bacterias aeróbicas de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas (ISO 20776-1: 2006).

Por otra parte, los compuestos fenólicos, además de sus propiedades antimicrobianas, se sabe que tienen la capacidad antioxidante debido a su papel como eliminadores de radicales libres. Su potencial antioxidante depende del número y disposición de los grupos hidroxilo y el grado de estructura de conjugación ( Rice-Evans, Miller, y Paganga, 1996). Un reactivo con una triple función como saborizante, antioxidante (prevención de la descomposición química de los alimentos) y antimicrobiana (contra microorganismos patógenos y de descomposición) sería de interés para la industria alimentaria, ya que permitiría a la cantidad total de los aditivos utilizados en los alimentos para ser reducida. (Gutiérrez M., 2012).

## 5.2. **EXPERIMENTO 2. EXTRACCIÓN COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL CACAO.**

### 5.2.1. INTRODUCCIÓN

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato. Esta definición se enfoca en la importancia que tiene la matriz o tejido sobre el cual va a actuar el antioxidante y se observa que según este término pueden existir diferentes tratamientos antioxidantes dependiendo del sitio de acción y del origen del mismo; pero no se tenían en cuenta otros aspectos y sistemas del metabolismo, por lo cual se simplifica la definición a “cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula” (Gutteridge y Halliwell 1995 citado por Cuevas et al. 2008). El oxígeno es esencial para los organismos vivos.

Sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (EROS) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico. Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN, no

obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de EROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento. La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal, entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años (Díaz, 2011).

El objetivo de este PFG fue la evaluación de diferentes métodos para la extracción compuestos con actividad antioxidante a partir de subproductos del cacao.

## **5.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.2.1. Materiales**

Recolección de la materia prima y su adecuación, se realizó según lo descrito en el ítem 5.1.2.2 y 5.1.2.3 del capítulo anterior.

### **5.2.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para determinar la capacidad antioxidante de la cáscara de mazorca de cacao, se prepararon distintos extractos obtenidos a partir de ésta, los cuales se obtuvieron como se describe a continuación: utilizando la técnica de extracción por agitación (equipo mesa agitadora TECNAL modelo TE-1401), y dos tipos de soluciones de extracción (solución de etanol - agua relación 1:1, acidificado con HCl al 1% y sin acidificar), la variable respuesta es la capacidad antioxidante la cual se mide en  $\mu\text{m TE}/100 \text{ g muestra}$ .

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizaron 3 métodos (ABTS, FRAP, ORAC), cada análisis se realizó por triplicado para un total de 6 unidades muestrales por método.

**DISEÑO EXPERIMENTAL:** en esta ocasión, la variable independiente fue el tipo de extracto (con ácido clorhídrico y sin ácido clorhídrico) y la variable dependiente fue la capacidad antioxidante, obtenidos en ambos casos al utilizar los métodos de ORAC, ABTS y FRAP.

#### **5.2.2.3. Obtención de los extractos.**

Para la obtención de los diferentes extractos se utilizaron recipientes color ámbar a una relación 1:10 cáscara de cacao- solución de extracción (etanol: agua 50:50 acidificada con HCl al 1% y sin acidificar). Las extracciones se realizaron en un mesa agitadora TECNAL modelo TE-1401 por un tiempo de 6 horas a temperatura ambiente (25°C), luego de extraídos los compuestos se filtraron en papel filtro corrugado industrial, el filtrado se aforó a un volumen conocido.

#### **5.2.2.4. Método de ORAC**

Este método fue adaptado del método descrito por Ou, Hampsch-Woodill, y Prior (2001) Modificado por Gil, (2013). Todos los reactivos se preparan en buffer fosfato 10 mM a pH 7,4. Como estándar se utilizó trolox en el rango de concentración (0-200µM). Una mezcla de fluoresceína (150µL de una solución de 1 µM en buffer fosfato) y la muestra (25µL de una dilución 1:100) se pre-incuba durante 30 min a 37°C, luego se le adiciona 25 µL de una solución de AAPH 250 mM preparada en buffer fosfato. Se mide la intensidad de fluorescencia cada 2 minutos durante 120 minutos a una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 520nm, respectivamente. La caída en la

intensidad de la fluorescencia indica la oxidación de la FL por radicales piróxilo derivados del AAPH. Los resultados de los extractos se compararon con curvas construidas con concentraciones conocidas de trolox. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se calcula el área bajo la curva (AUC) y los resultados se expresan como micromoles equivalente de Trolox (TE) por cada 100g de muestra ( $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ ).

#### **5.2.2.5. Método de ABTS**

Este método empleado en este PFG fue adaptado del original descrito por Leighton, Urquiaga y Diez, (1997) para un volumen de 3 mL. Las mediciones de absorbancia se realizan a una longitud de onda de 732 nm empleando un espectrómetro (Génesis 20). El radical ABTS se genera por la reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) (3,5 mM) con per sulfato de potasio (1,25 mM). Después de 16 h de reacción, se diluye el reactivo ABTS concentrado con solución buffer fosfato a pH 7,4 hasta absorbancia  $0,70 \pm 0,01$ , a una longitud de onda de 732 nm.

Para la evaluación se emplearon 150  $\mu\text{L}$  del extracto diluido y 2850  $\mu\text{L}$  de la solución del radical ABTS+, luego de 7 min de reacción a temperatura ambiente y oscuridad, se lee el cambio en la absorbancia de la muestra. También, se midió el blanco (Buffer) y la referencia (solvente) en iguales condiciones. Los resultados se expresaron  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ .

#### **5.2.2.6. Técnica de FRAP**

El ensayo FRAP se determinó sobre la base de la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ a un color azul  $\text{Fe}^{2+}$  + TPTZ (Benzie y Strain, 1996). El reactivo FRAP se preparó mediante la mezcla de 300 mM de tampón de acetato (pH 3,6), 10 mM y 20 mM TPTZ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10:01:01, en a 37 ° C. El reactivo FRAP (3 mL), se pipeteó en tubos de ensayo.

Posteriormente, se añadió un total de 100 L de muestra y 300 L de agua destilada a los mismos tubos de ensayo y se incubó a 37 ° C durante 4 min. Cada muestra se realizó por triplicado. Se midió la absorbancia a 593 nm y el valor FRAP se calculó utilizando la ecuación descrita por Benzie y Strain (1996). En este ensayo, el potencial antioxidante de la muestra se determinó a partir de una curva patrón trazada utilizando, FeSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O en un rango de concentración entre 200 y 1000 mM.

### 5.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La decisión de que tratamiento utilizar para la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la cáscara de la mazorca de cacao, va a depender del comportamiento del producto al cual le queramos aplicar dicho antioxidante, sin embargo estos análisis solo nos dan solo una idea del comportamiento real, es por ello que se recomienda realizar análisis más detallados en las matrices de aplicación (análisis *in vivo*).

Cuadro N°8. Capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de mazorca de cacao.

Tratamiento	FRAP ( μm TE/100 g muestra)		ORAC ( μm TE/100 g muestra)		ABTS ( μm TE/100 g muestra)	
	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica	Media	Desviación típica
Agitación sin HCl	13660.13 a	792.10	32450.66 b	4385.34	16500,88 a	430,88
Agitación con HCl	15285.34 b	1623.17	25150.94 a	1514.91	14903,993 a	1363,59

Letras diferentes indican diferencias significativas (p≤0.05)

Fuente: Autoría propia.

Como se puede observar en el cuadro 8, el contenido de antioxidantes en la cáscara de mazorca de cacao de este estudio, es inferior al de la semilla de cacao seca de la USDA (2010), que reporta valores ORAC de 55.653  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$  y en las semillas de cacao colombianos de 63.951 a 38.729  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$  Carrillo et al (2013), Según Beda, M et al (2013) de la vaina (cascara) de cacao de Costa de Marfil presenta valores ABTS 5187  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra y FRAP 12950  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, menores a los encontrados en este estudio, con valores FRAP de 13660.13 - 16904.25  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, ABTS 11603,12 - 22961,57  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra y ORAC de 25150.94 - 34292.71  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra.

El potencial antioxidante de los compuestos polifenólicos depende del número y disposición de los grupos hidroxilo y el grado de estructura de conjugación (Gutiérrez M et al. 2012)

Es muy difícil evaluar la actividad antioxidante de un producto sobre la base de un único método (Číž et al., 2010). Un único método proporcionará información básica sobre las propiedades por lo que se han recomendado procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración.

No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* brindan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*, alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los

procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS), (Kuskoski et al., 2005).

El reconocimiento del potencial para la salud del chocolate es un desarrollo reciente, que finalmente se ha negado a los delirios de larga data acerca de su adversidad nutritiva. Beneficios para la salud de los diferentes productos de cacao provienen de los polifenoles del cacao y su capacidad antioxidante, lo que justifica el aumento del interés de los científicos de todo el mundo sobre este tema.

Sin embargo, menos atención se ha dedicado a la determinación precisa de la composición polifenólica en un gran número de productos de cacao disponibles todos los días para los consumidores de todo el mundo. Teniendo en cuenta el hecho de que un método estandarizado para la cuantificación de los polifenoles y capacidad antioxidante de diversos productos derivados de las plantas no se ha establecido aún, las pequeñas discrepancias entre los resultados reportados en este estudio no son sorprendentes, ya que los resultados dependen de la preparación de la muestra y el método empleada.

### **5.3. EXPERIMENTO 3 DISEÑO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL CACAO.**

#### **5.3.1. INTRODUCCIÓN**

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de sustancias heterogéneas de alto peso molecular resultante del metabolismo secundario en plantas (Soler, 2009), formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil-ésteres, glucósidos, etc. (Soler, 2009), dichos compuestos poseen capacidad bioactiva y antioxidante y son los compuestos bioactivos más abundantes en la dieta.

Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. (Arranz, 2010). Además son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides (Nava, 2009).

La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se basa en su capacidad secuestradora de radicales libres (scavengers) y de quelación de metales. Su estructura química es la ideal para reaccionar con los radicales libres y formar un radical intermedio más estable y menos reactivo, ya que la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo permite que se deslocalicen los electrones, además pueden actuar de quelantes y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales (Soler, 2009).

En los últimos años, los consumidores de todo el mundo se han vuelto más cautelosos con respecto a los alimentos y sus ingredientes. Recientemente, ha surgido un gran interés en el uso de los compuestos bioactivos derivados de plantas naturales en los alimentos como "aditivos alimentarios multifuncionales", debido a sus efectos nutricionales y terapéuticas adicionales. Recientes estudios indican que los beneficios para la salud atribuidos al cacao es precisamente gracias a su contenido de polifenoles, cabe señalar que cacao y sus productos no sólo son ricos en polifenoles (Belscak, Komes, 2009).

## **5.3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.3.2.1. Variable independiente**

- Tipo de extracto (con ácido clorhídrico y sin ácido clorhídrico)

### **5.3.2.2. Variable dependiente**

- Contenido de polifenoles.

### **5.3.2.3. Materiales**

Recolección de la materia prima y la adecuación de la materia prima se realiza según lo descrito en el ítem 6.3.2 y 6.3.3 (capítulo 1).

### **5.3.2.4. Preparación de los extractos**

La recolección de la materia prima y la adecuación de la materia prima se realiza según lo descrito en el ítem 5.1.2.2 y 5.1.2.3.

### **5.3.3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN CIICALTEU**

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin Ciocalteu (Severo et al., 2009), empleando alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  de extracto, 150  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin Ciocalteu, 8 minutos más tarde se adicionaron, 450  $\mu\text{L}$  de solución de carbonato de calcio al 20% (m/v) y 2370  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo por un total de 2 horas, midiendo lecturas en un espectrofotómetro (Génesis 20) a 765nm.

La curva patrón se realizó tomando ácido gálico como referencia. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente (EAG) por gramo de muestra. Las lecturas se realizaron por triplicado tanto para los patrones como para el extracto analizado.

Los resultados obtenidos se expresaron con la media  $\pm$  desviación estándar y se expresaron con el valor promedio de las 3 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

Los análisis experimentales se realizaron por triplicado para cada método y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza

(ANOVA) de clasificación simple y prueba de rango múltiples de Duncan empleando el software IBM SPSS Statistics Versión 21.

### 5.3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios realizados por Carrillo et al (2013) han reportado que los valores de polifenoles en semillas de cacao colombianos están entre 44,940 – 70,090 mg EAG/gramos, Beda, M et al (2013) ha reportado un contenido de polifenoles de la vaina cacao de 68,93 mg EAG/g (cacaos procedentes de costa de marfil), valores mayores a los encontrados en la cáscara de mazorca de cacao de este estudio.

Cuadro N°9. Contenido de compuestos polifenólicos de los extractos de la cáscara de mazorca de cacao.

POLIFENOLES mg EAG/g muestra)		
Tratamiento	Media	Desviación típica
Agitación sin HCl	16,4012 a	0,41854
Agitación con HCl	19,2632 b	0,45861

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Fuente: Autoría propia.

Los resultados descritos en la Cuadro N° 9, describen que los resultados estadísticos, e evidencian diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las soluciones de extracción, el mayor contenido de compuestos polifenólicos se puede evidenciar en el tratamiento con HCl (19,2632 mg EAG/g muestra) con respecto al tratamiento sin HCl (16,4012 mg EAG/g muestra), los cuales son estadísticamente diferentes.

Los beneficios para la salud de los polifenoles del cacao, ha incrementado el interés para obtención en semillas y los subproductos del mismo.

Los principales compuestos flavan-3-ol presentes en el cacao son los monómeros catequina y epicatequina, y el B2 procyanidin (dímero). El contenido de estos compuestos es importante, ya que un gran número de estudios han informado de que la biodisponibilidad de los polifenoles de cacao está fuertemente relacionada con el tamaño molecular, con polifenoles más pequeños es generalmente más beneficioso.

La prevención del cáncer a través de la dieta está recibiendo cada vez más interés, y el cacao, debido a sus compuestos polifenólicos se ha convertido en un importante potencial quimiopreventivo y agente natural terapéutico. Según recientes investigaciones el cacao contiene importantes polifenoles que interfieren en la iniciación, promoción y progresión del cáncer. Los flavonoides del cacao han demostrado varias funciones biológicas importantes *in vitro* y *in vivo* por su capacidad de eliminación de radicales libres.

#### **5.4. DISEÑO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (POLIFENOLES) A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA DE CACAO.**

##### **5.4.1. INTRODUCCIÓN**

Los análisis de capacidad antimicrobiana, antioxidante, y el contenido de compuestos polifenólicos descritos en los ítems 5.1, 5.2 y 5.3 de la presente investigación, nos dan un indicio de los posibles usos que tienen las cáscaras de mazorca de cacao (principal residuo de la industria cacaotera). Las cáscaras de mazorca de cacao poseen capacidad antioxidante (prevención de la descomposición química de los alimentos), antimicrobiana (contra microorganismos patógenos y de descomposición), y un contenido considerable de compuestos polifenólicos, dichas características son de interés para la industria alimentaria, ya que permitiría reducir o reemplazar la cantidad total de los aditivos utilizados en los alimentos y de esta forma obtener alimentos más seguros e inocuos.

Para la formulación de los alimentos y las bebidas enriquecidas con sustancias antioxidantes y antimicrobianas, estas deben ser extraídas preferentemente de sus fuentes naturales. El estudio y desarrollo de procesos tecnológicos para la obtención de materias primas a partir de productos naturales tiene una importancia vital dentro del desarrollo de las industrias alimenticias y farmacéuticas a nivel internacional (Sarmiento L., Machado R., Petrus J., Tamanini T., Bolzan A. 2008). El proceso de extracción de principios activos a partir de las plantas medicinales es uno de los pasos críticos en el desarrollo de productos naturales y su uso comercial. La extracción es un proceso que envuelve la separación de la porción activa de interés de la porción inactiva mediante el empleo de un componente inerte selectivo (disolvente) (Rodríguez C., González L., Armas M., 2010).

Basados en lo anteriormente descrito, el objetivo del presente capítulo consiste en: Diseñar de un sistema de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de cacao y calcular el costo de obtención de dichos compuestos.

#### **5.4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El diseño de sistema de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de cacao se realizó tomando en consideración los resultados de Rodríguez, González y Armas (2010)

El costo de obtención de compuestos polifenólicos se determinó con base a la relación entre los factores que se presentan a continuación:

- ✓ Materia Prima (Cáscara de Mazorca de cacao)
- ✓ Mano de Obra
- ✓ Equipos y materiales
- ✓ Reactivos

- ✓ Costos indirectos.

En la determinación de costos además se tuvo en cuenta:

- ✓ Los equipos utilizados se estiman el costo de arriendo incluido en el mismo el gasto energético.
- ✓ En los costos estimados para la materia prima incluyen el transporte de la misma desde el cultivo hasta la universidad. Pagando un precio mínimo pues esta se considera un desecho en las plantaciones.
- ✓ La mano de obra contempló la supervisión del proceso (la persona encargada no tiene dedicación exclusiva en la producción del extracto);
- ✓ Los costos indirectos se estimaron en un 20% de los costos directos de producción.

#### 5.4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según lo encontrado en la presente investigación, la técnica recomendada para la obtención de compuestos polifenólicos de la cáscara de cacao es la técnica que incorporó la adición de ácido clorhídrico (HCl), que es un ácido que facilita el proceso de hidrólisis y por ende a la obtención de más compuestos polifenólicos, aunque su proceso de purificación puede ser más costoso por lo que desde el punto de vista económico es más recomendable utilizar la extracción que no incorpora HCl.

Luego de realizada la investigación, basado en el proceso realizado a escala de laboratorio se recomienda utilizar el proceso descrito en la figura 13. Dicho proceso involucra los siguientes pasos:

- ✓ **Recepción de la materia prima:** El cacao se recibe en la planta, para lo cual se deben tener parámetros de aceptación o castigo, como son: índice de madurez, tamaño, color, entre otros.

- ✓ **Pesado:** una vez recibido el cacao es necesario pesarlo con el fin de determinar la cantidad recibida, dato esencial para conocer los rendimientos de la operación, este valor se reporta al proveedor.
- ✓ **Selección y clasificación:** ésta se efectúa en seco tratando de escoger los cacaos aptos según las condiciones del proceso, la clasificación es con el propósito de determinar características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas requeridas.
- ✓ **Lavado:** existen dos maneras de realizarlo, por inmersión o por aspersión dependiendo del tipo de maquina lavadora con que se cuente. En el lavado por inmersión: la fruta es introducida en un canal con agua caliente con el fin de ayudar a la remoción de partículas y suciedad. Este lavado se puede combinar con agua caliente y fría. En el lavado por aspersión: la fruta se somete a la acción de la fuerza de las gotas de agua en forma de chorro, mientras va girando la fruta en la lavadora, también puede combinarse con agua caliente y fría.
- ✓ **Reducción de tamaño:** La reducción de tamaño se hace con el fin de facilitar el proceso de escaldado, este proceso incorpora el corte del fruto del cacao en dos partes separando las semillas de las cáscaras. Las cáscaras se reducen de tamaño con un procesador de vegetales (cubos de 1 cm de largo por 1 cm de ancho y 3mm de espesor)
- ✓ **Escaldado acido:** este paso del proceso es de mucha importancia en la calidad del producto final. Con el escaldado se logran los siguientes beneficios: fijar el color, inactivar enzimas que pueden afectar la coloración final y favorecer la oxidación. El escaldado para este proceso se recomienda a  $75^{\circ}\text{C} \pm 2$  aproximadamente, durante un tiempo no mayor de 6 minutos. Esta operación puede realizarse en una marmita. La solución de escaldado para este caso es una solución acuosa de ácido cítrico al 1%
- ✓ **Secado:** es un método de conservación de alimentos consistente en extraer el agua de estos, lo que inhibe la proliferación de microorganismos y dificulta la putrefacción. Este proceso se hace con el fin de tener disponible en

todo momento cáscara de mazorca de caco para alimentar el proceso de producción de extracto. Se recomienda secado solar o secador en bandejas.

✓ **Molienda:** es el proceso utilizado cuando es necesaria una reducción de tamaño inferior, la molienda es importante porque permite tener partículas pequeñas que van a tener mayor superficie de contacto solvente- matriz de extracción y va a hacer mucho más eficiente el proceso.

✓ **Mezclado:** se efectúa con el objeto de lograr una distribución uniforme de los componentes entre sí por medio del flujo. Dicho flujo es producido generalmente por medios mecánicos. El proceso de mezclado es recomendable realizarlo en materiales aislados de la luz, para el proceso descrito es recomendado manejar una relación 1:10 cáscara de cacao seca y molida: solución de extracción (etanol- agua en relación 50:50).

✓ **Agitación:** se realiza con el fin de aumentar la superficie de contacto del solvente y la solución de extracción, el proceso recomendado para este caso es la agitación por un tiempo entre 4 y 6 horas de extracción estableciendo una velocidad constante de 200 rpm.

✓ **Filtración:** proceso unitario de separación de sólidos en suspensión en un líquido mediante un medio poroso, que retiene los sólidos y permite el pasaje del líquido, en este proceso se separa la solución de extracción de las cáscaras de mazorca de cacao.

✓ **Purificación y concentración:** consiste en realizar la separación de los solventes de extracción del extracto de interés mediante un proceso de evaporación y condensación de los solventes para su posterior utilización.

✓ **Empaque y almacenamiento:** extracto de cáscara de mazorca de cacao se empaca o envasa, según las especificaciones del producto (envase color ámbar), el envase ayuda a proteger la calidad del producto aislándolo de posibles contaminaciones provenientes del medio externo.



### 5.4.3.1. Balance económico del proceso de obtención de compuestos bioactivos a partir de la cáscara de mazorca de cacao.

Al comparar de ambas tecnología de extracción (Cuadro 12), se encontró más del 50% de los costos de producción correspondieron con gastos energéticos, lo que constituye un punto de partida para trabajos futuros de optimización de estos procesos de relativamente poca complejidad tecnológica.

Es importante destacar que la adición HCl a la solución de extracción significó un incremento del costo de producción a un 2,46 %, sin embargo, tuvo que tuvo como beneficios mejoras significativas en los rendimientos y en la actividad FRAP, lo que abre un camino para trabajos futuros de desarrollo de nuevos productos antioxidante en la industria de los alimentos. La decisión de qué tratamiento utilizar para la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la cáscara de la mazorca de cacao, va a depender del comportamiento radical del producto al cual le queramos aplicar dicho antioxidante.

Cuadro 10. Costos detallados de producción de extracto de cáscara de mazorca de cacao a nivel de laboratorio en USD (dólares estadounidenses) con extracto acidificado con HCl.

COSTOS DE PRODUCCION TRATAMIENTO CON ETANOL:AGUA 50:50 6 horas acidificado					
RECURSO	UNIDADES	VALOR (USD)	REQUERIMIENTO	DESCROPCIÓN DEL REQUERIMIENTO.	VALOR (USD)/L
<b>Materia Prima (Cáscara de Mazorca de cacao)</b>					<b>0,00826</b>
<b>Materia Prima (Cáscara de Mazorca de cacao)</b>	kg	0,08264	0,1	Para la producción de 1 litro de extracto se requiere 100g de cáscara.	0,00826
<b>Mano de Obra</b>					<b>3,71901</b>
Mano de Obra Directa (asignada al proceso)	Hora	0,61983	6	Supervisión del proceso.	3,71901
<b>Equipos alquiler x hora incluye gasto energético</b>					<b>13,84298</b>
Mesa Giratoria	Unidad	0,53719	4	Agitación.	2,14876

Procesador	hora	0,74380	1	Reducción de tamaño	0,74380
Horno de Secado	hora	0,33058	24	Secado	7,93388
Molino	hora	0,12397	21	Reducción de tamaño	2,60331
Balanza Analítica	hora	0,82645	1	Pesaje de material	0,41322
<b>Reactivos</b>					<b>2,25207</b>
Etanol 98%	L	2,47934	1	Extracción	1,23967
HCl 5%	L	26,85950	0	Extracción	0,80579
Agua destilada	L	0,41322	1	Extracción	0,20661
<b>Materiales</b>					<b>0,49587</b>
Arriendo de espátula	Unidad	0,08264	1	Preparar materia prima	0,08264
Arriendo de Colador	Unidad	0,12397	1	Preparar materia prima	0,12397
Arriendo de Frascos de Vidrio Ámbar x 200mL	Unidad	0,04132	5	Obtención de extractos.	0,20661
Papel Filtro	Unidad	0,08264	1	Filtración de extractos	0,08264
<b>COSTO DE OBTENCION DE EXTRACTO DIRECTOS</b>				Costos directos	<b>20,31818</b>
<b>COSTOS INDIRECTOS</b>				20% Costos directos	<b>4,06364</b>
<b>COSTOS TOTALES (USD)</b>				<b>56,78</b>	<b>24,38182</b>

\*Las etapas de purificación, empaque y distribución no se incluyeron en el balance económico descrito.

Fuente: Autoría propia.

En el Cuadro 10, se muestran los estimados de los costos de producción de concentrados de compuestos fenólicos de cáscara de mazorca de cacao a nivel de laboratorio en USD (dólares estadounidenses) utilizando como agentes de extracción, etanol: agua acidificada con HCl (50:50).

Cuadro 11. Costos detallados de producción de extracto de cáscara de mazorca de cacao a nivel de laboratorio en USD (dólares estadounidenses) con extracto sin acidificar.

<b>COSTOS DE PRODUCCION TRATAMIENTO CON ETANOL:AGUA 50:50 6 horas sin acidificar</b>					
RECURSO	UNIDADES	VALOR ( USD)	REQUERIMIENTO	DESCROPCIÓN DEL REQUERIMIENTO.	VALOR ( USD)/L
<b>Materia Prima (Cáscara de Mazorca de cacao)</b>					<b>0,00826</b>
<b>Materia Prima (Cáscara de Mazorca de cacao)</b>	kg	0,08264	0,1	Para la producción de 1 litro de extracto se requiere 100g de cáscara.	0,00826
<b>Mano de Obra</b>					<b>3,71901</b>
Mano de Obra Directa (asignada al proceso)	hora	0,61983	6	Supervisión del proceso.	3,71901
<b>Equipos alquiler x hora incluye gasto energetico</b>					<b>13,84298</b>
Mesa Giratoria	Unidad	0,53719	4	Agitación.	2,14876
Procesador	hora	0,74380	1	Reducción de tamaño	0,74380
Horno de Secado	Hora	0,33058	24	Secado	7,93388
Molino	Hora	0,12397	21	Reducción de tamaño	2,60331
Balanza Analítica	Hora	0,82645	1	Pesaje de material	0,41322
<b>Reactivos</b>					<b>1,44628</b>
Etanol 98%	L	2,47934	1	Extracción	1,23967
Agua destilada	L	0,41322	1	Extracción	0,20661
<b>Materiales</b>					<b>0,49587</b>
Arriendo de espátula	Unidad	0,08264	1	Preparar materia prima	0,08264
Arriendo de Colador	Unidad	0,12397	1	Preparar materia prima	0,12397
Arriendo de Frascos de Vidrio ámbar x 200mL	Unidad	0,04132	5	Obtención de extractos.	0,20661
Papel Filtro	Unidad	0,08264	1	Filtración de extractos	0,08264
<b>COSTO DE OBTENCION DE EXTRACTO DIRECTOS</b>				Costos directos	<b>19,51240</b>
<b>COSTOS INDIRECTOS</b>				20% Costos directos	<b>3,90248</b>
<b>COSTOS TOTALES (USD)</b>					<b>23,41488</b>

\*Las etapas de purificación, empaque y distribución no se incluyeron en el balance económico descrito.

Fuente: Autoría propia.

Cuadro 12. Comparación de costos de producción de extracto de cáscara de mazorca de cacao a nivel de laboratorio en USD (dólares estadounidenses).

<b>COSTO DE OBTENCION DE EXTRACTO EN USD (Dólar estadounidense)</b>		
<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>ACIDIFICADO CON HCL AL 1%</b>	<b>SIN ACIDIFICAR</b>
Materia Prima (Cáscara de Mazorca de cacao)	0,00826	0,00826
Mano de Obra	3,71901	3,71901
Equipos alquiler x hora incluye gasto energético	13,84298 (56, 78%)	13,84298 (59,12%)
Reactivos	2,25207 (9,23%)	1,44628(6,77%)
Materiales	0,49587	0,49587
<b>COSTOS INDIRECTOS</b>	<b>20,31818</b>	<b>19,51240</b>
<b>COSTOS TOTALES</b>	<b>24,38182</b>	<b>23,41488</b>

Fuente: Autoría propia.

En el cuadro 12, se presentan los resultados de los indicadores anteriores cuando se realizó la extracción con y sin la adición de ácido.

### **Consideraciones finales**

Se comprobó que el extracto de cáscara de cacao del clon TSH 565 tiene capacidad antimicrobiana, en mayor eficiencia para las bacterias Gram (+) que para las bacterias Gram (-). Los resultados evidencian que el extracto posee un efecto bactericida y bacteriostático para el *Staphylococcus aureus*, y solo bacteriostático para el caso de *Escherichia coli*. La concentración inhibitoria mínima para la *Staphylococcus aureus* fue de 1.152 ppm y 12.500 ppm para la *Escherichia coli*. El efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* y

*Escherichia coli* se evidencia por la ausencia de crecimiento de estos microorganismos, a partir de la concentración de 6.250 ppm para el caso del *Staphylococcus aureus* y 50.000 ppm para *Escherichia coli*.

Los resultados obtenidos son de importancia para distintas industrias como la farmacéutica y la de alimentos, ya que nos dan una idea de los potenciales usos, las concentraciones de aplicación y los tiempos de acción de los mismos; en el caso de la industria de alimentos los resultados nos muestran utilidad en alimentos en donde prolifere el crecimiento de microorganismos Gram negativos, como es el caso de los quesos que son mayormente atacados por *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, se demostró que las cáscaras de mazorca de cacao son fuente de compuestos con capacidad antioxidante, y ésta varía teniendo en cuenta el radical de exposición y la técnica de extracción. Los resultados del poder antioxidante del extracto (obtenido 50:50 etanol y agua) de las cáscaras de mazorca de cacao frente a radicales de FRAP, es más efectiva con extracciones acidas (acidificado el medio de extracción con HCl 1%) el cual reporta valores de 15.285,34  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, con respecto al mismo tratamiento no ácido 13.660,13  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra. La capacidad antioxidante para los radicales de ORAC es mayor en los tratamientos no ácidos 32.450,66  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, que en los ácidos 25.150,94  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra, igual comportamiento presenta el radical ABTS con valores de potencial antioxidante de 16.500,88  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  muestra en los tratamientos no ácidos frente a 14.903,99  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$  en ácidos. La decisión de que tratamiento utilizar para la extracción de compuestos antioxidantes a partir de la cáscara de la mazorca de cacao, va a depender del comportamiento radical del producto al cual le queramos aplicar dicho antioxidante.

Por otra parte, el proceso de obtención de compuestos polifenoles con potencial antioxidante y antimicrobiano puede ser económicamente rentable, los costos

de producción de la misma pueden variar teniendo en cuenta el diseño del proceso, pero los costos serán mucho más bajos a medida que la tecnología de obtención se masifique. El balance económico realizado en la presente investigación nos da un estimado de los costos de producción por litro de extracto para la técnica de extracción que incorporó el solvente etanol y agua 50:50, la técnica de agitación a 200rpm y tiempo de 6 horas acidificado con HCl al 1% (24,38 dólares estadounidenses) y sin acidificar (23,41 pesos dólares estadounidenses).

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indican de la utilidad de las cáscaras de mazorca de cacao antioxidante (prevención de la descomposición química de los alimentos) y antimicrobiana (contra microorganismos patógenos y de descomposición), dichas características son de interés para la industria alimentaria, ya que permitiría reducir o remplazar la cantidad total de los aditivos utilizados en los alimentos y de esta forma obtener alimentos más seguros e inocuos.

## 6. CONCLUSIONES

El extracto de cáscara de cacao del clon TSH 565 tiene capacidad antimicrobiana, en mayor eficiencia para las bacterias Gram (+) que para las bacterias Gram (-). Los resultados evidencian que el extracto posee un efecto bactericida y bacteriostático para el *Staphylococcus aureus*, y solo bacteriostático para el caso de *Escherichia coli*.

La concentración inhibitoria mínima para la *Staphylococcus aureus* fue de 1.152 ppm y 12.500 ppm para la *Escherichia coli*.

El poder antioxidante del extracto (obtenido 50:50 etanol y agua) de las cáscaras de mazorca de cacao frente a radicales de FRAP, es más efectiva con extracciones acidas (acidificado el medio de extracción con HCl al 1%) el cual reporta valores de 15.285,34  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$ , con respecto al mismo tratamiento no ácido 13.660,13  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$ .

La capacidad antioxidante para los radicales de ORAC es mayor en los tratamientos no ácidos 32.450,66  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$ , que en los ácidos 25.150,94  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$ .

Los valores de potencial antioxidante ABTS fueron mayores en los tratamientos de extracción no ácidos (16.500,88  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$ , que en los tratamientos de extracción en ácidos (14.903,99  $\mu\text{m TE}/100\text{ g}$ ).

Los costos de producción por litro de extracto para la técnica de extracción que incorporó el solvente etanol y agua 50:50, la técnica de agitación a 200rpm y

tiempo de 6 horas acidificado con HCl al 1% (24,38 dólares estadounidenses) y sin acidificar (23,41 pesos dólares estadounidenses).

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican una posible utilidad de las cáscaras de mazorca de cacao como antioxidante (prevención de la descomposición química de los alimentos) y antimicrobiana (contra microorganismos patógenos y de descomposición), dichas características son de interés para la industria alimentaria, ya que permitiría reducir o remplazar la cantidad total de los aditivos utilizados en los alimentos y de esta forma obtener alimentos inocuos y más seguros.

## 7. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar análisis “in vitro” para determinar la efectividad de los compuestos bioactivos en matrices alimenticias.
- ✓ Optimizar las técnicas de obtención de los compuestos bioactivos en las cáscaras de mazorca de cacao.
- ✓ Purificar y encapsular los compuestos bioactivos de cascaras de mazorca de cacao para poderlos aplicar en matrices alimenticias.
- ✓ Diseñar el escalamiento de obtención de los compuestos bioactivos a escala industrial para el aprovechamiento de este subproducto.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGROCADENAS, La cadena del cacao en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica (en línea). (2005). Acceso 25 de mayo de (2013). [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_agronet/2005112145659\\_caracterizacion\\_cacao.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112145659_caracterizacion_cacao.pdf).
2. Acero C, (2011). Antimicrobianos naturales: conservando los alimentos de forma natural. [Versión electrónica]. Revista superior de gastronomía. Universidad Gastronómica. n.d.
3. Alberto et al., 2002 M.R. Alberto, M.E. Farías, M.C. Manca de Nadra. Effect of wine phenolic compounds on *Lactobacillus hilgardii* 5w viability. *Journal of Food Protection*, 65 (2002), pp. 211–213
4. Almajano M., (2009). Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de Goji. [En línea]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/anfemoro/actividad-antioxidantedelasbayasdegoji>.
5. Álzate L, Arteaga D, Jaramillo Y. 2009. [en línea]. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/77/1/367-394.pdf> [2014, 10 de febrero].
6. Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, D. J., Arlorio, M., et al. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3530–3535.
7. Arques et al., (2008). J.L. Arques, E. Rodriguez, M. Nuñez, M. Medina Inactivation of gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system *European Food Research and Technology*, 227 (1) (2008), pp. 77–82
8. Aslim and Yucel, (2007). B. Aslim, N. Yucel In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp *Food Chemistry*, 107 (2) (2007), pp. 602–606
9. Armada L. y Ros C., (2007) Manipulador de alimentos: La importancia de la higiene en la elaboración y servicio de comidas. [En línea]. Disponible en:

<http://books.google.com.co/books?id=TdQoX6U8MsEC&printsec=frontcover&dq=Manipulador+de+alimentos:&hl=es&sa=X&ei=xGwaU-O4CMfQkQe08IDAAG&ved=0CDkQ6wEwAA#v=onepage&q=Manipulador%20de%20alimentos%3A&f=false>.

10. Ardila, S. C., y Carreño, J. S. (2011). Aprovechamiento de la cáscara de la mazorca de cacao como adsorbente. Tesis de pregrado, Universidad industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
11. Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A. L., & Bompeix, G. (2008). In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest Apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1–2), 13–19.
12. Arranz, S. (2010). Compuestos Polifenólicos (Extraíbles Y No Extraíbles) En Alimentos De La Dieta Española: Metodología Para Su Determinación E Identificación. Universidad Complutense, Madrid.
13. Ayala-Zavala et al., (2008). J.F. Ayala-Zavala, G. Oms-Oliu, I. Odriozola-Serrano, G.A. González-Aguilar, E. Álvarez-Parrilla, O. Martín-Belloso Bio-preservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials *European Food Research and Technology*, 226 (5) (2008), pp. 1047–1055
14. Beda, M. otros dos autores más. Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *International Journal of Food and Nutrition*, 2013, Vol. 1, No. 3, 38-46 (2013)
15. Belščak, Komes, Horz'ic', Kovac'evic', Karlovic (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* 42 (2009) 707–716
16. Brandi et al., (2006) G. Brandi, G. Amagliani, G.F. Schiavano, M. De Santi, M. Sisti Activity of Brassica oleracea leaf juice on food borne pathogenic bacteria *Journal of Food Protection*, 69 (9) (2006), pp. 2274–2279
17. Bousmaha-Marroki, L., Atik-Bekkara, F., Tomi, F., & Casanova, J. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* maire from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19(5), 490–493.

18. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
19. Cabrera Y., Fadragas A., Guerrero L. (2005). Antibióticos naturales. Mito o realidad. *Rev Cubana Med Gen Integr* v.21 n.3-4 Ciudad de La Habana.
20. Carrillo, L. et al . (2013). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia International. *Journal of Food Science and Technology*, FRIN-04694
21. Ceylan, E., & Fung, D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12(1), 1–55.
22. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3530–3535.
23. Cheng W., Kuo C., Chi T., Lin L., Lee C., Feng R., Tsai S. (2013) Investigation on the trend of food-borne disease outbreaks in Taiwan (1991e2010). *journal of food and drug analysis* 21 (2013) 261e267
24. Cuellar, G. O., y Guerrero, A. G. (2012). Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L. [versión electrónica]. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia de córdoba*, 17(3), 3176-3183.
25. Cuevas; M., Antezana, A. y Winterhalter, P. (2008). Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) Boliviano. Universidad Mayor San Simón Cochabamba. Sucre a Parque la Torre, Cochabamba, Bolivia.
26. Cushnie and Lamb, (2005) T.P.T. Cushnie, A.J. Lamb Antimicrobial activity of flavonoids *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5) (2005), pp. 343–356
27. Crescente, O.; Acosta, M; Guevara, M; Estaba, A. (1998). Aprovechamiento de los Desechos de Cacao. Universidad del Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.
28. Cuellar, G. O., y Guerrero, A. G. (2012). Actividad antibacteriana de la cáscara

- de cacao, *Theobroma cacao* L. Falta el año Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia de Córdoba, 17(3), 3176-3183.
28. Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(6), 2576–2581.
29. Díaz, J. (2011). Optimización de extracción y análisis de la capacidad antioxidante de la piel de kiwi. Tesis de maestría, Universidad politécnica de Catalunya, España, p 6.
30. De Ancos et al. (falta la inicial del nombre del autor principal) (2015). Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain.
31. F. Demirci, K. Guven, B. Demirci, M.Y. Dadandi, K.H.C. Baser (2008), Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens *Food Control*, 19 (4) pp. 1159–1164
32. Davidson and Taylor, (2007) P.M. Davidson, T.M. Taylor *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds* M.P. Doyle, L.R. Beuchat (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (3rd ed.), ASM Press, Washington, DC 713–745
33. El-Zemity, S. R., Radwan, M. A., El-Monam, M., & Sherby, S. A. S. M. (2008). Antibacterial screening of some essential oils, monoterpenoids and novel Nmethyl carbamates based on monoterpenoids against *Agrobacterium tumefaciens* and *Erwinia carotovora*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(6), 451–461.
34. Falta el título y revisar el enlace ya que no abre documento alguna. FAO (2012). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/MEETING/004/Y1956S.HTM>. Fecha de Consulta 26 – 12-14.
35. FEDECACAO. Federación Nacional de Cacaoteros. (2013). [consultado el día 20/03/2014; 9:32] de <http://www.fedecacao.com.co/site/index.php/1nov-novedades/2nov-noticias/1542-2013-07-30-nota1>

36. Fernández y otros cinco autores. Storage stability of a high dietary fiber powder from orange by-products. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 748–756. (2009).
37. FINAGRO. Fondo para el financiamiento del sector agropecuario. Participación mundial de Colombia en la producción de cacao año (2013) [Obtenido el día 14/11/2013] de <http://www.finagro.com.co/productos-y-servicios/informaci%C3%B3n-sectorial>.
38. Franco C. M., Ramírez H. M., García G. R., Bernal G. M., Espinosa A. B., et al. (2010). Reaprovechamiento integral de residuos agroindustriales: cáscara y pulpa de cacao para la producción de pectinas. [Versión electrónica]. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 1 (2), 45-66.
39. Garcia A. (2014) ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS. Grupo Urgencias y Emergencias en Salud Pública (2014). Disponible en <http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Coves%202014/11.%20COVE%20Diciembre%202014/Presentaciones/Vigilancia%20Plan%20Fin%20de%20A%C3%B1o/ETA.pdf>. Consultado 05- 01-15
40. García, V. (2011). Introducción a la microbiología. [En línea]. Universidad estatal a distancia.
41. GARCÍA, J.; PERIAGO, M.; VIDA, M.; RAMÍREZ, C y. GIL, A. (2004). Evaluación Nutricional Y Estado Antioxidante de un Grupo de Ancianos Institucionalizados de Murcia, Caracas.
42. Geney y Rios (2014) “Obtención y Cuantificación de Compuestos Polifenólicos en la Cáscara de la Mazorca de Cacao (Teobroma cacao L.) y Evaluación de su Actividad Antioxidante”. Tesis para optar el título de Ingenieras de Alimentos. Universidad de Córdoba – Colombia, Noviembre de 2014.
43. Georgé, S., Brat, P., Alter, P., y Amiot, M. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(5): 1370-1373.
44. Gil Q. (2012). Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis para

optar el título de magister en química farmacéutica ya alimentaria. Universidad de Antioquia, Medellín.

45. Greule, M., & Mosandl, A. (2008). Heptan-2-ol and trans-linalool oxide (fur.) as inherent indicators of natural blackberry Xavour using enantio selective andmultielement-MDGC-IRMS analysis. *European Food Research and Technology*, 226, 1001–1006.
46. Guerrero, A.; Panizo, G. y López, C. (2000). Actividades Antioxidante Y Fotoprotectora de la Secrección de *Cryptomphalus aspersa* (principio activo de endocare), industria farmacéutica Cantabria.
47. Guerrero, M. S., Torres, J. S., & Nuñez, M. J., (2008). Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource Technology*, 99, 1311–1318
48. Gulcin S., Reza R., Marotta F. Chapter (2013). - The microbial metabolism of Polyphenols and Health

#### REVISAR LA FORMA DE CITAR ESTAS REFERENCIAS

49. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008a). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91–97.
50. Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008b). Efficacy of plant essential oils against food borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection*, 71(9), 1846–1854.
51. Gutiérrez M. et al (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. Department of Molecular Biology, University of León, Spain.
52. Hammer et al., (1999) K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts *Journal of Applied Microbiology*, 86 (1999), pp. 985–990
53. Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., y Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after

reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(7): 1785-1790.

54. R.L. Hall (1997). Food-borne illness: implications for the future *Emerging Infectious Diseases*, 3, pp. 555–559 View Record in Scopus| Full Text via CrossRef| Citing articles (19)
55. Ho, C. L., Wang, E. I. C., Wei, X. T., Lu, S. Y., & Su, Y. C. (2008). Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. From Taiwan. *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 328–334.
56. Jiyong Kim<sup>1</sup>, Ki Won Lee, Hyong Joo Lee (2011). Cocoa (*Theobroma cacao*) Seeds and Phytochemicals in Human Health (falta la fuente de la publicación)
57. Kahl, R. y Kappus, H. (1993). Toxicology of the Synthetic Antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z Lebensm ut.-dez*.
58. Kim, J., Wei, C. I., & Marshall, M. R. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43(11), 2839–2845.
59. Kuskoski, M.; Asuero, A.; Troncoso, A.; Manzini, J.; Rfet, T. (2005). Aplicación de Diversos Métodos Químicos Para Determinar Actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campinas*, 25(4): 726-732.
60. Leighton, F, Urquiaga, I. y Diez, M., (2001) Propiedades Antioxidantes del Vino y Sus Componentes. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, *Revista Cubana Plantas Medicinales Scielo*, 13:4
61. Liu et al., (2008). L. Liu, P. O'Conner, P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis* *Journal of Applied Microbiology*, 104 (2008), pp. 1059–1066
62. Lopez-Malo vigil et al., (2005). A. Lopez-Malo vigil, E. Palou, S.M. Alzamora Naturally occurring compounds plant sources P.M. Davidson, J.N. Sofos, A.L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (3rd ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida (2005), pp. 429–446

63. Lopez-Malo vigil, A., Palou, E., & Alzamora, S. M. (2005). Naturally occurring compounds plant sources. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (3rd ed., pp. 429–446). Boca Raton, Florida: CRC Press.
64. Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69(8), 1732–1738
65. LÖLIGER, J. (1991). Natural anti-oxidants. *Lipid Technology* 3:56-61.
66. Madigan et al., (1997) M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker *Biology of microorganisms* (8th Ed.)Prentice-Hall International Inc., New Jersey (1997)
67. Macfaddin J (2004). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 3ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 850.
68. Madhavi, D.; Singhal, R. y Kulkarni, P. (1996). *Tecnological Aspects of Food Antioxidants en Food Antioxidants* (Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. Eds.). Merce Dekker Inc., New York, NY.
69. Mahmoud, B. S. M., Kawai, Y., Yamazaki, K., Miyashita, K., & Suzuki, T. (2007). Effect of treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on the proximate composition, amino acid and fatty acid composition of carp fillets. *Food Chemistry*, 101(4), 1492–1498.
70. Márquez, E. (2006). *Actividad Antioxidante Total de Algunas Hortalizas Evaluadas Mediante el Ensayo de FRAP*.
71. Martínez, C., Hermida, H., Beltran L., (2005). *La Cadena de cacao en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinamica*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. Observatorio Agro – Cadenas.
72. Martínez, J. 2007. *Evaluación de la Actividad Antioxidante de Extractos Orgánicos de Semillas de (Helicarpus Terebinthinaceus)* Ingeniería de alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca.
73. Martínez et al., (2008). B. Martinez, J.M. Obeso, A. Rodriguez, P. Garcia Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus* *International Journal of Food Microbiology*, 122 (3) (2008), pp. 253–258

74. Murthy, P. S., & Naidu, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 897–903. (2012).
75. Ministerio Nacional de salud. Vigilancia y control en salud pública. (2010). [en línea]. Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ETA.pdf>
76. Mutasem E., Ghanimeh, S. Maroun, R. Alameddine, I. (2012) Climate change and temperature rise: Implications on food- and water-borne diseases. Department of Civil and Environmental Engineering, American University of Beirut, Lebanon.
77. Nava, D. (2009). Estudio de cambios estructurales y en algunos compuestos fenólicos durante la elaboración de Tescüino de maíz azul (*Zea mays*). Tesis para optar al grado de Doctor. Instituto politécnico nacional, México, D.F., p 29.
78. Navas, J. (2005). Optimización y control de la calidad y Estabilidad de aceites y productos de fritura, división de ciencias de la salud. Universidad de Barcelona.
79. Okuda, T., Yoshida, T., y Hatano, T. (1989). New methods of analyzing tannins. *Journal of Natural Products*. 52(1): 1-31.
80. Ortoño M, (2005). La cara oculta de alimentos y cosméticos. . [En línea]. Disponible en: <http://books.google.com.co/books?id=D05E519eSDMC&pg=PA33&dq=conservantes+sinteticos+en+alimentos&hl=es&sa=X&ei=gCoIU8WqFcXIsATmslLQCg&ved=0CDoQ6AEwAw#v=onepage&q=conservantes%20sinteticos%20en%20alimentos&f=false> [ 2014, 22 de febrero]
81. Paredes, F.; Clemente, A.; (2005). Polifenoles de aplicación en farmacia: Metabolismo y acción biológica. *Offarm*. 24 P. 85 – 94.
82. PROEXPORT COLOMBIA. Cacao colombiano fino y de aroma. (2012). Edición de internet. Disponible en: <http://www.inviertaencolombia.com.co/images/Perfil%20Cacao%202012.pdf>.
83. Rajalakshmi, D. y Narasimhan, S., 1996. Food antioxidants: sources and methods of evaluation (Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. Eds.). MerceL Dekker Inc., New York, NY.

84. Rawel, H; Kulling, S. (2007). Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2 P 399 – 406.
85. Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yoshinari, T., Rezaee, M. B., Jaimand, K., Nagasawa, H., et al. (2008). Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 228–233.
86. Rice-Evans et al., (1996). C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (1996), pp. 933–956
87. Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 P 3438 – 3442.
88. Robins, R. (2009). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(10): 2866-2887.
89. Rodríguez C., González L., Armas M., (2010). Desarrollo de un proceso tecnológico a escala de laboratorio para la extracción de polifenoles totales del fruto de la *Punica granatum* L. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.
90. Rodríguez, J.; Valdez, O. y Alemán, A. (2006). Evaluación de La Actividad Antioxidante de Cinco Hierbas Aromáticas. Instituto de Investigaciones Para La Industria Alimenticia, la Habana, Cuba.
91. Rojano, B.; Gaviria, C. y Gil, M. (2008), Actividad Antioxidante del Isoespintanol en Diferentes Medios. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
92. Romeo, F. V., De Luca, S., Piscopo, A., & Poiana, M. (2008). Antimicrobial effect of some essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 373–379
93. Rosales L (2010). Laboratorio de bacteriología. Facultad de ciencias químicas, Universidad Autónoma de Chiapas. México.

94. Roshni M. y Arun K., (2012). Chapter Five – Modern Approaches in Probiotics Research to Control Foodborne Pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research* Volume 67, 2012, Pages 185–239.
95. Sánchez-Zapata et al., (2009). Preparation of dietary fibre powder from tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk (“horchata”) byproducts and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7719–7725.
- SOLER, A. 2009. Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional. Tesis para optar al grado de Doctor, Universidad de Lleida, España, Lleida, p 44.
96. Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2001). 1, 8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Digestive Diseases and Science*, 46(2), 331–337.
97. Sarmiento L., Machado R., Petrus J., Tamanini T., Bolzan A. (2008) Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. *The Journal of Supercritical Fluids*. Volume 45, Issue 1, May 2008, Pages 64–69.
98. Singleton, V., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299(12): 152-178.
99. Soliman and Badeaa, (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chemical Toxicology*, 40 (2002), pp. 1669–1675
100. Torres M. Torres C. Salas, Blanch (2014). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry* 166 (2015) 125–132
101. Turner et al., (2007). S.A. Turner, N.A. Thompson, M.J. Aldist Variation of lactoferrin and lactoperoxidase in bovine milk and the impact of level of pasture intake *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50 (2007), pp. 33–40

102. Vatted et al., (2004). Phenolic antioxidant mobilization in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *Lentinus edodes* and effect on antimicrobial activity against select food-borne pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 5 (2004), pp. 81–91
103. Von Staszewski M. (2011). Impacto de la interacción entre polifenoles de té verde y proteínas del lactosuero sobre las propiedades biológicas y funcionales de las mezclas. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
104. Vieira C., Dantas M. Prieto M. (2014). Tolerance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to nisin combined with EDTA is accompanied by changes in cellular composition. *Food Research International*. Volume 69, March 2015, Pages 281–288
105. Viuda-Martos, et al (2012), Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses powder co-product. *Journal of Food Engineering*, 110, 220–224
106. Rodríguez Saucedo, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas [Versión electrónica]. *Revista Ra Ximhai*, 7 (1), 153-170.
107. Tajkarimi M., Ibrahim S., Cliver O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21 (2010) 1199–1218
108. TRADEMAP, (2013). Estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas. Datos comerciales mensuales, trimestrales y anuales. Valores de importación y exportación, volúmenes, tasas de crecimiento, cuotas de mercado, etc.
109. Valenzuela B, Alfonso. (2007). El chocolate, un placer saludable. [Versión electrónica]. *Revista chilena de nutrición*, 34 (3), n.d.
110. Wollgast J.; (2000). Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33 423±447
111. Wu et al., (2008) V.C.H. Wu, X.J. Qiu, A. Bushway, L. Harper Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on

foodborne pathogens LWT – Food Science and Technology, 41 (2008), pp. 1834–1841

112. Yeoup C. B., Kenji I., y Wan H. K. (2003). Compositional Characterization of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Hull. [Versión electrónica]. Revista Agricultural Chemistry, 46(1), 12-16.
113. Zumbo, A. (1998). Polyphenols in cocoa: are there health benefits? BNF Nutrition Bulletin, 23, 94-102.

# **ANEXOS**

## Anexo 1: Chárter del PFG

### ACTA (CHARTER) DEL PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN (PFG)

**Nombre y apellidos:** Liliana Esther Sotelo Coronado

**Lugar de residencia:** Montería – Colombia/ Tr. 16 # 12-74 barrio Edmundo López

**Institución:** Servicio Nacional de Aprendizaje SENA – Seccional Córdoba.

**Cargo / puesto:** Gestora de proyectos.

Información principal y autorización del PFG	
<b>Fecha:</b> 21 de septiembre de 2014	<b>Nombre del proyecto:</b> “DISEÑO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE A PARTIR SUBPRODUCTOS DE LA PRODUCCIÓN CACAOTERA”.
<b>Fecha de inicio del proyecto:</b> Oct 2014	<b>Fecha tentativa de finalización:</b> Febrero de 2014
<b>Tipo de PFG</b> Tesis.	
<b>Objetivos del proyecto:</b>	
<b>General</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Diseñar un proceso de producción de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana y antioxidante a partir subproductos de la producción cacaotera, para el aprovechamiento de este subproductos que no tiene valor comercial y que en la actualidad está causando problemas de contaminación ambiental, en la obtención de compuestos de interés para la industria de alimentos como antioxidantes o antimicrobianos que sustituyan aditivos químicos no asimilables por el organismo humano, mejorando de esta forma la inocuidad de los mismo.</li></ul>	
<b>Específicos</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Diseñar un proceso de extracción de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de subproductos del cacao, para usarlo como un método de conservación en alimentos</li></ul>	

altamente atacados por microorganismos.

- Diseñar un proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante a partir de subproductos del cacao, para usarlo como sustituto de conservantes químicos perjudiciales para el organismo humano, en alimentos de alta inestabilidad.
- Diseñar un proceso de extracción de compuestos polifenólicos a partir de subproductos del cacao, para poder aprovechar el potencial de los subproductos de la industria del cacao en la obtención de compuestos con potencial en la industria de alimentos.
- Diseñar un proceso industrial de extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos de cacao y calcular su costo de producción, para conocer la rentabilidad del proceso de obtención de los mismos.

#### **Justificación de la investigación**

La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos como bacterias, levaduras y mohos; es por esto que se adicionan en el procesamiento de los alimentos compuestos que reduzcan o inhiban el crecimiento de estos, para alargar la vida útil desde su producción hasta llegar al consumidor. El problema del deterioro microbiano de los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, entre otros.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo), (estudio de Matamoros (citado en Rodríguez, 2011)).

La presencia de bacterias en los alimentos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, pueden causar infecciones e intoxicaciones alimentarias las cuales pueden ser letales para el ser humano (INAS, 2010).

El cultivo de cacao cuenta con ventajas comparativas en Colombia derivadas de las condiciones naturales para su producción, esto es, de las características agroecológicas en términos de clima y humedad (Agro cadenas). Las cáscaras de cacao representan un alto porcentaje del peso total del fruto (aproximadamente el 70%), lo cual lo convierte en el principal desecho, ya que representa un alto porcentaje por cada tonelada de semilla seca y constituye un grave problema para las industrias deshacerse de estas, sin embargo, su composición les da el potencial de ser utilizado para otros fines, por ejemplo para obtener

compuestos bioactivos y fibra dietética que podrían ser utilizados como ingrediente en la elaboración de alimentos. En la explotación cacaotera la cáscara no presenta un valor agregado a pesar de que se le atribuyen al cacao y a la misma cáscara compuestos y propiedades benéficas, al primero un contenido apreciable de polifenoles, en especial su alta proporción de flavonoides (Estudio de Dreosti: citado en Valenzuela, 2007) y al segundo compuestos como aminoácidos esenciales, lípidos (99 g/kg), minerales (96 g/kg), polisacáridos (330 g/kg total) (Yeoup et al. 2003). Beda, M et al 2013 ha reportado un contenido de polifenoles de la vaina cacao de 68,93 mg EAG/g (cacaos procedentes de costa de marfil), otros estudios han reportado el aprovechamiento de cáscaras de cacao en la producción de pectinas (Franco et al. 2010). Ardila y Carreño (2011) trabajaron con mazorcas de cacao para la producción de un material absorbente. Cuellar y Guerrero (2012) evaluaron la actividad antibacteriana de diferentes fracciones de la cáscara de cacao.

La industria alimentaria está experimentando una creciente demanda de nuevos ingredientes de origen natural, esta demanda ha motivado a los investigadores a obtener ingredientes a partir de subproductos agroindustriales (Guerrero, Torres, y Núñez, 2008; Fernández-López et al, 2009; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas et al, 2010; Viuda-Martos et al., 2011). Dependiendo de la disponibilidad de una tecnología adecuada, los subproductos pueden ser convertidos en productos comerciales, ya sea como materias primas para procesos secundarios (ingredientes alimentos intermedios) o como ingredientes de nuevos productos (Sánchez-Zapata et al., 2009), ganando cada vez más interés debido a que estos son productos de alto valor y su recuperación puede ser económicamente atractiva (Murthy y Naidu, 2012). La evaluación del potencial antimicrobiano de los compuestos fenólicos de la cáscara de la mazorca del cacao, es una alternativa para utilizarlos como agentes antimicrobianos que pueden ser usados en la conservación de alimentos, ya que, el fenol y sus derivados son compuestos bactericidas o bacteriostáticos, que dependiendo de la concentración utilizada tienen efecto sobre las bacterias, levaduras y hongos (García, 2011). A raíz de la nueva tendencia de los consumidores por productos frescos se ve la necesidad de buscar alternativas para obtener y utilizar agentes antimicrobianos de manera natural, ya que muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad microbiana los cuales pueden desempeñar el papel de prolongar la vida útil de los alimentos, el uso de estos aditivos alimentarios implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y sanitarias (Rodríguez, 2011).

Es por esto que se ve la necesidad o posibilidad de trabajar con compuestos fenólicos extraídos de la cáscara de la mazorca del cacao.

**Restricciones:** Ninguna identificada hasta el momento.

**Entregables:** Al finalizar el PFG, se realizará entrega de un documento (físico o electrónico) donde se haga referencia al aprovechamiento de subproductos de la industria del cacao en la obtención de compuestos bioactivos con potencial de uso en la industria de alimentos.

**Identificación de grupos de interés:**

**Cliente(s) directo(s):**

GRUPO DE INTERÉS (BENEFICIAIO)	RESULTADO ESPERADO
♣ Productores de cacao.	<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ Aprovechamiento de la Cáscara de mazorca de cacao.</li> <li>♣ Disminución de la contaminación ambiental producida por las cáscaras de mazorca de cacao.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ Grupo GIPAVE de la Universidad de Córdoba</li> <li>♣ Universidad de la cooperación internacional – UCI.</li> <li>♣ Comunidad Científica en general.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ Conocimiento de la concentración y tipos de compuestos polifenólicos extraídos de la cascara de mazorca de cacao.</li> <li>♣ Conocimiento del capacidad antimicrobiana y antioxidante de los compuestos polifenólicos presentes en la cascara de la mazorca de cacao.</li> </ul>

**Cliente(s) indirecto(s):**

GRUPO DE INTERÉS (BENEFICIARIOS)	RESULTADO ESPERADO
Empresas chocolateras.	<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ Aprovechamiento de un subproducto de la industria chocolatera.</li> <li>♣ Minimización de la contaminación ambiental</li> </ul>

	<p>ocasionada por las cascaras de cacao <i>Theobroma cacao L.</i></p> <p>♣ Obtención de compuestos antimicrobianos con potencial uso para mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos.</p>
Comunidad en General	♣ Oportunidad de desarrollar Agronegocios de producción aditivos naturales con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas, derivados de los subproductos de la producción local de cacao
<p><b>Aprobado por Coordinador académico:</b> Dr. Félix M. Cañet Prades</p>	<b>Firma:</b>
<p><b>Aprobado por Tutor (a):</b> Dr. Félix M. Cañet Prades</p>	<b>Firma:</b>
<p><b>Estudiante:</b> Liliana Esther Sotelo Coronado.</p>	<b>Firma:</b>

Anexo 2. Fuentes de antimicrobianos naturales en la planta investigadas en los últimos 10 años.

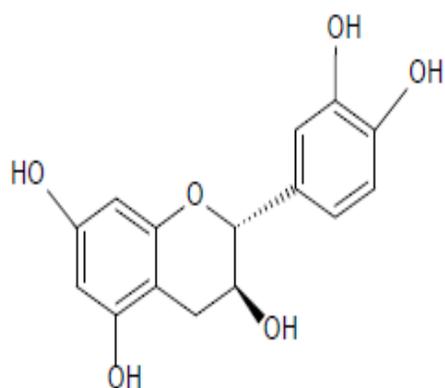
Nombre de la planta	Eficaz contra	Fuente:
Cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> ), orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), perejil ( <i>Petroselinum crispum</i> )	Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo <i>Listeria monocytogenes</i>	<u>Angioni et al., 2004</u> , <u>Ceylan y Fung, 2004</u> , <u>Daferera et al., 2000</u> , <u>El-Zemity et al., 2008</u> , <u>Gutiérrez et al., 2008a</u> , <u>Gutiérrez et al., 2008b</u> , <u>Kim y Wei et al., 1995</u> , <u>Lopes-Lutz et al., 2008</u> y <u>Santos y Rao, 2001</u>
Allipsea ( <i>Pimenta dioica</i> ), la albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> ), mallee azul ( <i>Eucalyptus polybractea</i> ), Bahía ( <i>Laurus nobilis</i> ), alcaravea semilla ( <i>Carum carvil</i> , limoncillo ( <i>Cymbopogon citratus</i> ), Melisa ( <i>Melissa officinalis</i> ), Marijoram ( <i>Origanum majorana</i> ) , romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ), y Sage ( <i>Salvia officinalis</i> )	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Angioni et al., 2004</u> , <u>Burt, 2004</u> , <u>Ceylan y Fung, 2004</u> , <u>Daferera et al., 2000</u> , <u>El-Zemity et al., 2008</u> , <u>Greule y Mosandl de 2008</u> , <u>Gutiérrez et al., 2008a</u> , <u>Gutiérrez et al., 2008b</u> , <u>Kim y Wei et al., 1995</u> , <u>Lopes-Lutz et al., 2008</u> , <u>López-Malo vigilia et al., 2005</u> y <u>Santos y Rao, 2001</u>
Clavo de olor ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) Salvia ( <i>Salvia</i>	Los patógenos, tales como <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> ,	<u>Amiri et al., 2008</u> , <u>Burt, 2004</u> , <u>Ceylan y Fung, 2004</u> , <u>Greule y Mosandl de</u>

<p><i>officinalis</i>), canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>) y Marijoram (<i>Origanum majorana</i>), Allipse (<i>Pimenta dioica</i>)</p>	<p><i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p><u>2008</u> ,<u>Gutiérrez et al.</u>, <u>2008a</u> , <u>Gutiérrez et al.</u>, <u>2008b</u> , <u>Ho et al.</u>, <u>2008</u> , <u>Kim y Wei et al.</u> , <u>1995</u> y <u>López-Malo vigilia et al.</u>, <u>2005</u></p>
<p>La albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>), Bahía (<i>Laurus nobilis</i>), y limoncillo (<i>Cymbopogon citratus</i>)</p>	<p>Amplio espectro efecto antibacteriano contra microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos</p>	<p><u>Ceylan y Fung.</u>, <u>2004</u> y <u>Skocibusic et al.</u>, <u>2006</u></p>
<p>Blackberry (<i>Rubus</i> spp.), Bahía (<i>Laurus nobilis</i>), Basilio (<i>Ocimum basilicum</i>), Cilantro (hojas inmaduras de <i>Coriandrum sativum</i>), coriandro (<i>Coriandrum sativum</i> semillas), canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>), Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>), Marijoram (<i>Origanum majorana</i>) y tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)</p>	<p><i>Staphylococcus</i> spp s.</p>	<p><u>Burt, 2004</u> , <u>Gutiérrez et al.</u>, <u>2008a</u> , <u>López-Malo vigilia et al.</u>, <u>2005</u> , <u>Romeo et al.</u>, <u>2008</u>, <u>Gutiérrez et al.</u>, <u>2008a</u> , <u>Gutiérrez et al.</u>, <u>2008b</u> , <u>López-Malo vigilia et al.</u>, <u>2005</u> y <u>Romeo et al.</u>, <u>2008</u></p>
<p>Orégano (<i>Origanum vulgare</i>), Salvia (<i>Salvia officinalis</i>), tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) y Satureja hortensis L.</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i></p>	<p><u>Bousmaha-marroki et al.</u>, <u>2007</u> , <u>Burt, 2004</u> y <u>Razzaghi-Abyaneh et al.</u>, <u>2008</u></p>

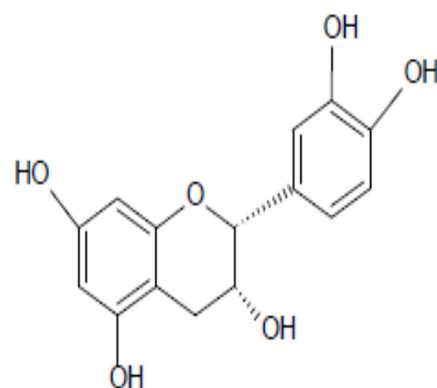
Mejorana ( <i>Origanum majorana</i> )	Alternativa de conservantes sintéticos utiliza rutinariamente en la industria alimentaria	<u>Mahmoud et al. (2007)</u>
El comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Ceylan y Fung (2004)</u>
Eneldo ( <i>Anethum graveolens</i> )	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	<u>Ceylan y Fung (2004)</u>
Hinojo ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	<u>Ceylan y Fung (2004)</u>
El ajo ( <i>Allium vineale</i> )	Amplio espectro efecto antibacteriano contra microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-	<u>Ceylan y Fung (2004)</u>

	negativos	
Menta ( <i>Mentha piperita</i> )	Amplio espectro efecto antibacteriano contra microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos	<u>Ceylan y Fung (2004)</u>
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<u>Ceylan y Fung (2004)</u>

Anexo 3. Estructuras de la (+)-catequina y (-)-epicatequina.



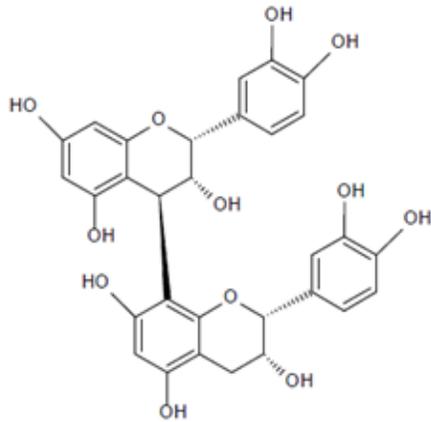
(+)-Catequina (2R, 3S)



(-)-Epicatequina (2R, 3R)

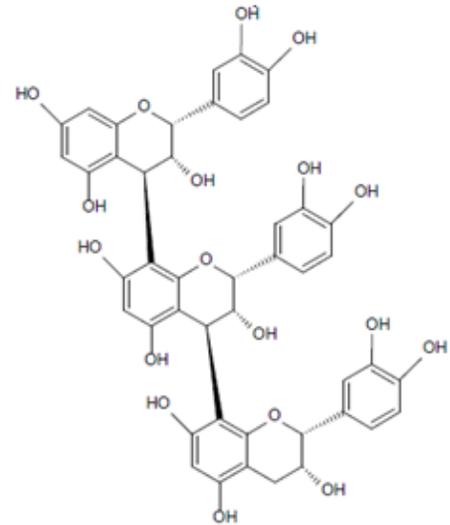
Fuente: Paredes y Clemente., 2005

Anexo 4. Estructuras de dímeros y trímeros de procianidinas en cacao



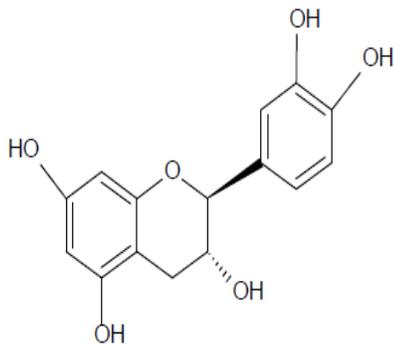
Dímero B2,  
Epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina

Fuente: Paredes y Clemente., 2005

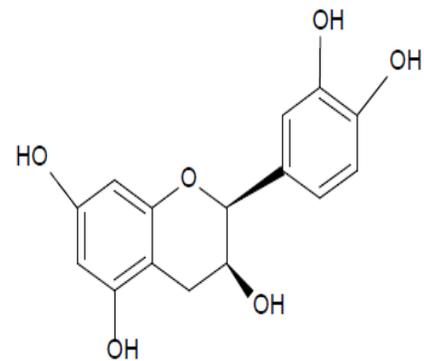


Trímero C1,  
[epicatequina-(4 $\beta$ →8)]<sub>2</sub>-epicatequina

Anexo 5. Estructura de la (-)-Catequina y la (+)-Epicatequina



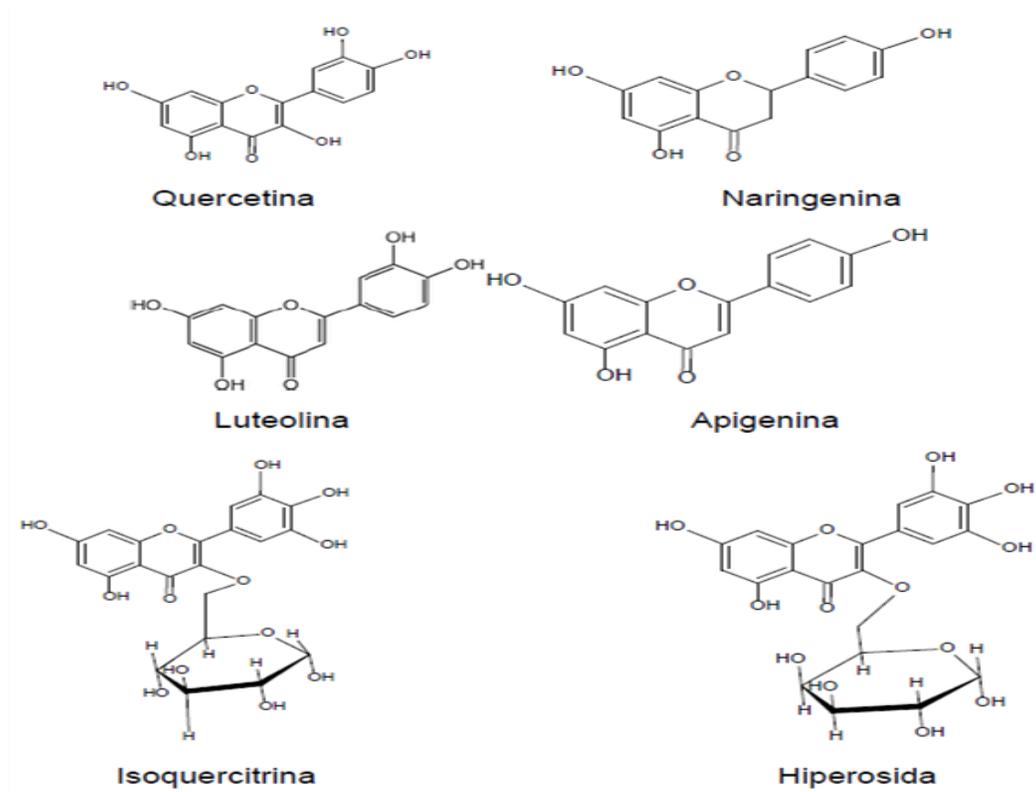
(-)-Catequina (2S, 3R)



(+)-Epicatequina (2S, 3S)

Fuente: Paredes y Clemente., 2005

Anexo 6. Estructura de polifenoles minoritarios en cacao.



Fuente: Paredes y Clemente., 2005