

Caracterización físico-química de la cascarilla de *Theobroma cacao* L, variedades Nacional y CCN-51

Physical-chemical characterization of *Theobroma cacao* L husk, National varieties and CCN-51

Erik Vivanco Carpio, Lisbeth Matute Castro, Mercedes Campo Fernández

erick_r_vc@hotmail.com

RESUMEN

En Ecuador se cultivan, principalmente, dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.), conocidas con el nombre de Cacao Arriba (Nacional) y la otra variedad llamada Híbrido (CCN-51). Las industrias del cacao y sus derivados situadas en el país generan 41 mil toneladas métricas anuales de desechos orgánicos originarios de la almendra de cacao (cascarilla de cacao). Por lo antes expuesto el presente estudio planteó como objetivo general analizar dichas propiedades en cascarillas de las variedades Nacional y CCN-51, obtenidas de la parroquia Saracay, sitio Naranjos de la provincia de El Oro. La evaluación de su calidad se inició con el análisis proximal, utilizando la metodología referida por las normas A.O.A.C International y normas venezolanas Covenin, obteniéndose un porcentaje bajo en ambas variedades en los parámetros de: humedad residual, cenizas, grasas, proteínas y acidez, mientras que en fibra dietaria y carbohidratos, el contenido que se reporta es alto en ambos casos. El estudio químico preliminar mediante tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa delgada (CCD), sugirió la presencia de azúcares reductores, compuestos fenólicos, flavonoides y actividad secuestradora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Adicionalmente, se cuantificó la presencia de teobromina 0,61 % en Nacional y 0,71 % en CCN-51, así como el porcentaje de vitamina C 0,04 mg/100 g y 0,03 mg/100 g para la cascarilla de Cacao Nacional y CCN-51, respectivamente. La determinación de compuestos fenólicos mostró mayor concentración en la variedad CCN-51 (2028 mg EAG/100 g) y Nacional (1020 mg EAG/100 g), sin embargo, la actividad secuestradora del radical libre (DPPH), resultó ser ligeramente inferior en la variedad CCN-51 (73,82 %); Nacional (87,28 %). Los estudios realizados con la cascarilla de cacao, aunque preliminares, proponen el uso de esta materia prima para la elaboración de productos novedosos y beneficiosos para la salud humana.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., CCN-51, DPPH, teobromina, folin-ciocalteu.

ABSTRACT

In Ecuador, two varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.), known as Cacao Arriba (National) and the other variety called Hybrid (CCN-51), are cultivated. The cocoa industries and their derivatives located in the country generate 41 thousand metric tons per year of organic waste originating from the cocoa almond (cocoa husk). For the foregoing, the present study proposed as a general objective to analyze said properties in the National and CCN-51 varieties, obtained from the Saracay parish, Naranjos site in the province of El Oro. The evaluation of its quality began with the analysis proximal, using the methodology referred to by the AOAC International standards and Covenin Venezuelan standards, obtaining a low percentage in both varieties in the parameters of: residual moisture, ash, fat, protein and acidity, while in dietary fiber and carbohydrates, the content it is reported is high in both cases. The preliminary chemical study by phytochemical screening and thin layer chromatography (CCD), suggested the presence of reducing sugars, phenolic compounds, flavonoids and kidnapping activity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Additionally, the presence of theobromine 0.61% in National and 0.71% in CCN-51 was quantified, as well as the percentage of vitamin C 0.04 mg / 100 g and 0.03 mg / 100 g for the Cocoa husk National and CCN-51, respectively. The determination of phenolic compounds showed higher concentration in the CCN-51 (2028 mg EAG / 100 g) and National (1020 mg EAG / 100 g) variety, however, the free radical scavenger activity (DPPH) was found to be slightly lower in the CCN-51 variety (73.82%); National (87.28%). The studies carried out with the cocoa husk, although preliminary, propose the use of this raw material for the production of novel and beneficial products for human health.

Keywords: *Theobroma cacao* L., CCN-51, DPPH, theobromine, folin-ciocalteu.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador se cultivan, principalmente, dos variedades de cacao, uno de ellos único en el mundo, conocido con el nombre de Cacao Arriba (Nacional) y la otra variedad llamada Híbrido (CCN-51). La superficie de cultivo de cacao en la región Costa, representa el 84 % de la superficie total a nivel nacional, mientras que en la región Sierra es el 8% y el resto que comprende la región Oriental y zonas en conflicto el 8 % ProEcuador (2015).

En la industria del cacao y sus derivados se genera un desecho muy importante que puede ser ingrediente principal en la elaboración de productos novedosos, ya aporta con proteínas,

carbohidratos, lípidos, vitamina C en mínimas cantidades, y con compuestos fenólicos, esta materia prima es la cascarilla de cacao. La cascarilla rodea al grano y se obtiene a partir del descascarillado de la semilla, este material representa, aproximadamente, alrededor del 12 % del peso de la semilla; es seca, crujiente y de color marrón (Sangronis et al., 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó una muestra de 5 kg de cascarilla de cacao para ambas variedades Nacional y CCN-51 de la parroquia Saracay, sitio Naranjos ubicada en el cantón Piñas de la provincia de El Oro. Los análisis realizados para el estudio de las propiedades físico-químicas de cascarilla de Cacao, fueron los siguientes:

Determinación de la pérdida por desecación: El porcentaje de humedad, determinación de cenizas, y determinación de acidez se llevaron a cabo bajo las Normas venezolanas COVENIN. La determinación de fibra dietética (A.O.A.C. 2001.03-2004), determinación de grasa mediante extracción por Soxhlet (923.2002), determinación de grasa mediante el resonador magnético nuclear (A.O.A.C. 923.03), determinación de proteínas (A.O.A.C. 920.103-1920), determinación de carbohidratos (A.O.A.C. 906.03-1906.), determinación de teobromina AOAC 980.14-1981(1998), determinación de vitamina C A.O.A.C 967.21-1968(2010). Se llevaron a cabo bajo las Normas A.O.A.C. Internacional.

Análisis químico preliminar mediante tamizaje fitoquímico: Los análisis químicos preliminares que se le realizaron a la muestra fueron de cloruro férrico (FeCl_3), ensayo de Fehling, y la prueba química preliminar de Shinoda, la materia prima fue sometida a una maceración dinámica con etanol y agua, por ultrasonido, en un equipo de marca Fisher Scientific modelo ultrasonic bath 5,7 L.

Análisis cromatográfico mediante capa delgada (CCD): Se realizó el análisis cromatográfico de los extractos hidroalcohólicos (Nacional y CCN-51), utilizando la relación 1 g de droga cruda, extraída con 10, 30 y 50 mL de menstruo, respectivamente. El revelado físico se desarrolló a través de la luz ultravioleta, a una longitud de onda de 254 nm. Para el revelado mixto se utilizó FeCl_3 y una solución metanólica al 0,2 % de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Determinación de polifenoles totales: Se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, relación droga cruda/menstruo (etanol absoluto 80 %): 1g droga/30 mL de menstruo para ambas variedades Nacional y CCN-51, con un tiempo de extracción de 15 min. El total de

polifenoles en el extracto se determinó a través del reactivo de Folin-Ciocalteu, en donde se tomaron 0,1 mL de muestra, patrón (ácido gálico) o agua destilada (blanco), se adicionaron 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (10 % en agua destilada) y 0,9 mL de agua destilada, se homogenizó y se esperaron 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 4 mL de carbonato de sodio al 7,5 %, se agitó bien y se dejó reposar por 2 horas. La lectura se realizó en el Espectrofotómetro UV-Visible de marca Shimadzu modelo UVmini-1240, a una absorbancia de 765 nm.

Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH): Las muestras evaluadas fueron las mismas antes preparadas. el procedimiento se realizó según el método del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). La capacidad antioxidante de la muestra se midió a 517 nm, observándose el cambio de coloración gradual del DPPH (púrpura) a DPPH-reducido (amarillo). Se preparó la disolución metanólica de DPPH a una concentración 0,1 mM.

DISCUSIONES

Como se puede apreciar en la tabla 1, el contenido de cenizas, es alrededor del 5 % en ambos casos, valor que habla a favor de la presencia de minerales en la cascarilla. En relación al contenido de fibra dietética, se muestran valores elevados, aunque de igual manera inferiores a los reportados por Villamizar Jaimes & López Giraldo (2016). Elevados valores en fibra le confieren propiedades beneficiosas para la salud humana (Baena, 2012; Carrasco, 2015).

Tabla 1. Análisis proximal de ambas variedades de cascarilla de cacao

Parámetros	Nacional Media / DS	CCN-51 Media / DS
Humedad (%)	8,74 / 0,05	6,43 / 0,05
Cenizas (%)	5,14 / 0,12	5,54 / 0,11
Fibra dietética (%)	41,96 / 0,85	40,14 / 0,23
Grasa (%)	2,25 / 0,18	1,56 / 0,27
Proteínas (%)	8,75 / 0,49	8,48 / 0,59
Carbohidratos (%)	35,24 / 0,11	26,38 / 0,13
Acidez (%)	0,14 / 0,05	0,11 / 0,02

Como se puede apreciar en la tabla 2 las dos variedades presentan porcentajes similares de proteínas, oscilando alrededor del 8 %. Sin embargo, este valor resulta superior a lo informado por bajo Quiñones-Gálvez & Dercy Parra (2015) e inferior según estudios realizados por Sangronis y colaboradores (2014).

Tabla 2. Análisis proximal de cascarilla de cacao según reportes de otros autores

Parámetros	(Sangronis et al.,2014)	(Villamizar & López, 2016)	(Soto Pereira, 2012)	(Cardona, y otros, 2002)
Humedad (%)	3,46-5,08	6,7	4,31	6
Cenizas (%)	7,51-8,09	11,4	7,81	7,9
Fibra dietética (%)	ND	56,8	ND	44
Grasa (%)	1,09-1,38	0,7	1,23	4,4
Proteínas (%)	18,54-19,69	6,3	18,91	15,6
Carbohidratos (%)	70,85-72,82	11,3	72,05	ND

ND: No determinada

Según el estudio fitoquímico cualitativo, el ensayo con cloruro férrico (FeCl_3) sugiere la presencia de taninos o compuestos fenólicos en general. Este resultado es coherente con lo que informa la literatura, pues se conoce que en la cascarilla hay concentraciones significativas de compuestos polifenólicos tales como catequinas, antocianidinas y proantocianidinas (Wollgast & Anklam, 2000; Abdul et al., 2014; Villamizar & López, 2017). Adicionalmente, se observó presencia de azúcares reductores y flavonoides, estos últimos en los extractos etanólicos de ambas variedades.

Análisis químico preliminar mediante CCD

En la evaluación cromatográfica de los extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones, al revelar la placa con luz ultravioleta a 254 nm, se pudo evidenciar que en los extractos hay metabolitos con presencia de grupos cromóforos conjugados en su estructura, los cuales absorben apreciablemente a esta longitud de onda (figura 1). Como puede apreciarse a un mismo valor de R_f de la cafeína, se muestra una mancha en cada uno de los extractos, lo que sugiere la presencia de este alcaloide en ambas muestras.

Como se aprecia en la figura 2 en ambas variedades a las diferentes concentraciones, se muestran decoloraciones, similares a la que exhibe la quercetina. Esto habla a favor de la actividad secuestradora de radicales libres que presentan las cascarilla. Esta actividad, se le atribuye, presumiblemente, los compuestos polifenólicos que quedaron en el punto de aplicación. La cafeína, así como el compuesto que corre a valores de R_f , ligeramente inferior, no posee, dicha actividad.

Figura 1. Perfil cromatográfico en placa delgada de los extractos de la variedad nacional (N), la CCN-51 (H), cafeína (C) y quercetina (Q), utilizando como fase móvil CHCl₃: MeOH (9:1 y revelado con luz UV 254 nm.



Figura 2. Perfil cromatográfico en placa delgada de los extractos de la variedad nacional (N), la CCN 51 (H), cafeína (C) y quercetina (Q), utilizando como fase móvil CHCl₃:MeOH (9:1), revelador DPPH (0,2 % MeOH)



N N C Q H H
1/30 1/50 1/30 1/50

La determinación de teobromina y vitamina C se muestra en la tabla 3. Si se comparan los resultados de las muestras objeto de estudio, con los referidos por otros autores, resultan inferiores. Lo anterior podría estar asociado, además, con el entorno geográfico donde se cosecha la planta, el suelo donde crece, el grado de maduración del fruto, incluso variaciones genéticas, entre otros factores intrínsecos y extrínsecos.

Tabla 3. Contenido de teobromina y vitamina C en la cascarilla de cacao de la variedad Nacional y CCN-51

Compuestos evaluados	Nacional Media / DS	CCN-51 Media / DS
Teobromina (%)	0,61 / 0,02	0,71 / 0,03
Vitamina C mg/100 g	0,04 / 0,01	0,03 / 0,01

Determinación de polifenoles totales

En los últimos años se ha demostrado que el aporte de polifenoles sea como suplemento o a través de la dieta, puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades, como las cardiovasculares (Quiñonez, Miguel, & Aleixandre, 2012).

Como se puede apreciar en la tabla 4, la variedad CCN-51 posee mayor concentración de polifenoles que la variedad Nacional. El análisis estadístico realizado determinó que existe una diferencia significativa de 0,033 ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos resultan satisfactorios, considerando lo que otros autores han referido (tabla 6).

Tabla 4. Contenido de polifenoles en la cascarilla de cacao de la variedad Nacional y CCN-51.

Relación droga/menstruo	Tiempo (min)	Variedad	Polifenoles (mg) EAG/100 g muestra
1/30	15	Nacional	1020/0,02
1/30	15	CCN-51	2028/0,09

Según los resultados obtenidos por otros autores, existen variaciones apreciables entre los diferentes estudios publicados, sin embargo, no se puede olvidar que la composición química de las plantas puede estar sujeta a variaciones como consecuencia de factores extrínsecos como el clima, el suelo o intrínsecos como la edad o factores biológicos (Amin & Chew, 2006; John, 2012).

Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres frente al 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Como se puede apreciar en la tabla 5, el porcentaje inhibitorio de DPPH en ambas muestras es alto, pero con mejor resultado en la variedad Nacional. Sin embargo, el análisis estadístico permitió conocer que no existe diferencia significativa entre las dos variedades 0,699 ($p > 0,05$). Algunos de los compuestos que pueden interferir en el porcentaje de DPPH son: azúcares reductores, aminoácidos y ácido ascórbico (Granato et al., 2016; Lester et al., 2012; Ludwig et al., 2013).

El contenido de azúcar en extractos puede interferir en la cuantificación de compuestos polifenólicos, sobre todo, si la concentración es muy alta o está presente la fructosa (Muñoz, y otros, 2017). Estudios plantean que la actividad antioxidante de la cascarilla podría disminuir tras el proceso de fermentación y tostado del grano, lo cual podría afectar los

componentes polifenólicos, usualmente asociados con la actividad antioxidante de los extractos o drogas vegetales (Abdul et al., 2014).

Tabla 5. Por ciento inhibitorio de DPPH en la cascarilla de cacao de la variedad Nacional y CCN-51

Dilución	Tiempo (min)	Variedad	% DPPH t=10 min	% DPPH t=30 min
1/30	15	Nacional	83,90/0,35	87,28/0,15
1/30	15	CCN-51	70,49/0,19	73,82/0,31

CONCLUSIONES

Al comparar el análisis proximal realizado en ambas variedades de cacao se puede concluir que las dos materias primas poseen características muy similares, mostrándose una diferencia más apreciable en el contenido de carbohidratos de la variedad nacional. Los ensayos cualitativos realizados mediante tamizaje fitoquímico en los extractos etanólicos y acuosos sugirieron la presencia de azúcares reductores (carbohidratos) y de compuestos fenólicos. La determinación de compuestos fenólicos sugirió una mayor concentración de estos metabolitos en la variedad CCN-51, sin embargo, la actividad secuestradora del radical libre (DPPH) resultó ser ligeramente inferior al comparar con la variedad Nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul, K., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P. & Abdullah, N. A. (2014). Antioxidant Properties of Cocoa Pods and Shells. *ResearchGate*, 8.

Amin, I. & Chew, L. (2006). Antioxidative Effects of Extracts of Cocoa Shell, Roselle Seeds and a Combination of Both Extracts on the Susceptibility of Cooked Beef to Lipid Oxidation. *Medwell Journals*, 10-15.

Quiñones-Galvez, D. & Dercy Parra, O. (2015). Caracterización bioquímica de hojas de clones de *Theobroma cacao* y su relación con los tricomas. *Scielo*, 8.

Baena, L. & García, N. (2012). *Obtención y caracterización de fibra dietaría a partir de cascarilla de las semillas tostadas de Theobroma cacao L. de una industria chocolatera colombiana*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.

Beda, M., Besson, V., Beourou, S. & Koff, K. (2014). Optimization of water-extract of phenolic and antioxidant compounds from Kinkéliba (*Combretum micranthum*) leaves. *African Journal of Food Science Research*, 37-43.

Botero, N., Londoño, L. & Rojas, L. (2016). Extracción de polifenoles totales asistida por enzimas, a partir de residuos de la industria del cacao. *Agronomía Colombiana*, 4. Camino, C. (2014). *Estudio del contenido de grasa, alcaloides y polifenoles totales en almendras de cacao nacional fino de aroma en zonas del litoral ecuatoriano para comparar su calidad y facilitar su comercialización*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

Cardona, M., Sorza, J., Posada, S., Carmona, J., Ayala, S. & Álvarez, O. (2002). Establecimiento de una base de datos para la elaboración de tablas de contenido nutricional de alimentos para animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 7.

Carrasco, O. (2015). *Obtención de harina baja en gluten a partir de la cascarilla de cacao de las variedades ccn-51 y nacional*. Machala. Universidad Técnica de Machala.

Granato, D., Sousa, J., Galvão, L. & Sávio, D. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *ScienceDirect*, 266-279.

Haytowitz, D. & Bhagwat, S. (2010). *USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2*. Beltsville: U.S. Department of Agriculture.

Lester, G., Lewers, K., Medina, M. & Saftner, R. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *ScienceDirect*, 102-107.

Ludwig, I., Bravo, J., Paz de Peña, M. & Cid, C. (2013). Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee. *ScienceDirect*, 553-559.

Muñoz, Ó., Torres, G., Núñez, J., de la Rosa, L., Rodrigo, J., Ayala, J. & Álvarez, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 6.

Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Kebitsamang, J., Lamine, M. & Camel, L. (2012). Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells. *Pakistan Journal of Nutrition*, 574-579.

ProEcuador. (2015). *Pro Ecuador*. Quito: ProEcuador.

Quiñonez, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *SciELO*, 13.

Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, Y. & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición Alan*, 8.

Sotelo, L., Alvis, A. & Arrázola, G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y caféina en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11.

Soto, M. (2012). *Desarrollo del proceso de producción de cascarrilla de semilla de cacao en polvo destinada al consumo humano*. Quito: Universidad Simón Bolívar.

Villamizar, A. & López, L. (2016). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Revista Científica de la Universidad Francisco de Paula Santander*, 9.

Villamizar, Y., Rodríguez, J. & León, L. (2017). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51. 1. *Cuaderno Activa*, 12.

Wollgast, J. & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Elsevier*, 24.