

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA.**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**



**Título de la pasantía de investigación.**

Métodos Colorimétricos para evaluar el contenido de flavonoides en diferentes genotipos de *Theobroma cacao L*, a nivel de semilla cruda y sus derivados (licor y chocolate).

**Presentado por.**

Daisy Yanira Martínez Reyes

**Para optar al grado de.**

Licenciatura en Ciencias Químicas.

**Asesor Interno.**

Licda. Jennifer Beatriz Chávez Zamora

**Asesor Externo.**

Dra. Vianney Castañeda de Ábrego

Ciudad Universitaria, julio 2025.

**AUTORIDADES**  
**DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**MSc. JUAN JOSE ROSA QUINTANILLA**  
**RECTOR**

**DRA. EVELYN BEATRIZ FARFÁN**  
**VICERRECTOR ACADEMICO**

**MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO**  
**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

**LIC. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA**  
**SECRETARIO GENERAL**

**AUTORIDADES**  
**DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**DR. LUIS GILBERTO PARADA GÓMEZ**  
**DECANO**

**DR. JOSE NERYS FUNES TORRES**  
**VICEDECANO**

**MSc. ANGELA GUDELIA PORTILLO ZELAYA**  
**SECRETARIO**

**MSc. JORGE ALBERTO VELASQUEZ REALES**  
**DIRECTOR DE LA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**

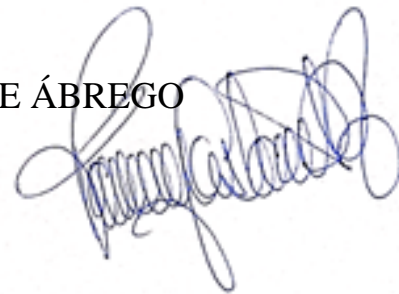
**PASANTÍA DE INVESTIGACIÓN APROBADA POR:**

**LICDA. DAMARIS MELANY HERRERA TURCIOS  
COORDINADORA DE PROCESOS DE GRADO**

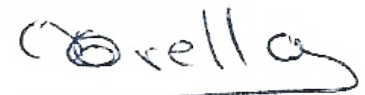
**LICDA. JENNIFER BEATRIZ CHÁVEZ ZAMORA  
DOCENTE ASESOR**



**DRA. VIANNEY CASTAÑEDA DE ÁBREGO  
ASESOR EXTERNO**



**TRIBUNAL EVALUADOR:**



**DR. NESTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO**

**DR. DIEGO FRANCISCO CHICAS BAÑOS**



## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
2	OBJETIVOS .....	3
2.1	Objetivo general .....	3
2.2	Objetivos específicos .....	3
3	MARCO TEÓRICO.....	4
3.1	Generalidades del cacao. ....	4
3.2	Genética del cacao. ....	5
3.3	Composición química de la semilla de cacao. ....	5
3.4	Los polifenoles. ....	7
3.4.1	Flavonoides .....	9
3.5	Efectos del cacao en la salud. ....	11
3.6	El cacao como fuente de polifenoles. ....	11
3.7	Procesos de Industrialización y Biocompuestos.....	12
3.7.1	Licor de cacao. ....	12
3.7.2	Chocolate.....	12
3.8	Métodos colorimétricos para determinar flavonoides. ....	13
3.8.1	Análisis fitoquímico para polifenoles. ....	13
3.8.2	Determinación cuantitativa de flavonoides. ....	14
3.9	Validación del método analítico. ....	16
3.9.1	Parámetros de validación: .....	16
4	METODOLOGÍA .....	18
4.1	Descripción del estudio. ....	18
4.2	Metodología Experimental. ....	18
4.2.1	Selección de muestras. ....	20
4.2.2	Tratamiento de las muestras.....	24
4.2.3	Desgrasado de las muestras.....	25
4.2.4	Obtención del extracto hidroalcohólico .....	26
4.2.5	Análisis Fitoquímicos.....	26
4.2.6	Determinación de flavonoides por el método de $AlCl_3$ .....	27
4.2.7	Determinación de flavonoides en muestras.....	31
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
5.1	Análisis Fitoquímicos .....	33

5.1.1	Identificación de Polifenoles totales. ....	33
5.1.2	Identificación de Flavonoides. ....	35
5.1.3	Identificación de Flavanoles.....	40
5.2	Determinación de flavonoides por el método de $AlCl_3$ . ....	41
5.2.1	Validación del método analítico.....	42
5.2.2	Determinación de flavonoides en muestras.....	48
6	CONCLUSIONES .....	53
7	RECOMENDACIONES.....	55
8	REFERENCIAS.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes mostrando características morfológicas del árbol y fruto del cacao. A. cojines florales mostrando flores pentámeras. B. características del árbol nótese la horquilla característica. C. fruto abierto mostrando la disposición de las semillas cubierta por un mucílago blanco. ....	4
Figura 2. Clasificación de los principales grupos de polifenoles y se añaden ejemplos característicos de cada grupo. Tomado de (Quiñones et al., 2004). ....	8
Figura 3. Esqueleto común de algunos flavonoides. Tomado de (Quiñones et al., 2004) .....	9
Figura 4. Principales grupos de flavonoides con ejemplos característicos de cada grupo. Tomado de (Quiñones et al., 2004). ....	10
Figura 5. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu .....	13
Figura 6. Reacción del ensayo de Shinoda. ....	14
Figura 7. Reacción del ensayo de Vainillina/HCl .....	14
Figura 8. Proceso de detección de una muestra en espectrofotometría UV-Vis y sus componentes. ....	15
Figura 9. Complejo metálico da coloración amarilla cuando se utiliza la quercetina como estándar. Tomado de (García,2014) .....	16
Figura 10. Diagrama de la metodología de laboratorio. Fuente: Propia. ....	19
Figura 11. Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia. ....	21
Figura 12. Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia. ....	21
Figura 13. Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia. ....	22
Figura 14. Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia. ....	22
Figura 15. Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia. ....	23
Figura 16. Esquema de tratamiento de las muestras de semillas crudas. Fuente: Propia.....	24
Figura 17. Identificación de polifenoles totales. ....	33
Figura 18. Escala de concentraciones de Polifenoles totales. ....	34

Figura 19. Identificación de flavonoides en Semillas crudas.....	35
Figura 20. Identificación de flavonoides en Licor. ....	37
Figura 21. Identificación de flavonoides en Chocolate.....	38
Figura 22. Identificación de Flavanoles. ....	40
Figura 23. Curva de calibración Absorbancia vs Concentración .....	42
Figura 24. Gráfico de residuales .....	44
Figura 25. Concentración de flavonoides en muestras de semilla cruda. ....	48
Figura 26. Concentración de flavonoides en muestras de licor.....	49
Figura 27. Concentración de flavonoides en muestras de chocolate.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Principales constituyentes químicos de la semilla de cacao. ....	5
Tabla 2. Materiales, reactivos y equipos. ....	19
Tabla 3. Esquema de la preparación de las disoluciones patrón que se utilizaron para obtener la recta de calibración. ....	27
Tabla 4. Identificación de polifenoles totales en semilla cruda. ....	34
Tabla 5. Colores RGB y sus códigos para la identificación de flavonoides en semilla cruda. ....	35
Tabla 6. Identificación de flavonoides en semilla cruda. ....	36
Tabla 7. Colores RGB y sus códigos para la identificación de flavonoides en licor. ....	37
Tabla 8. Identificación de flavonoides en licor. ....	38
Tabla 9. Colores RGB y sus códigos para la identificación de flavonoides en chocolate. ....	39
Tabla 10. Identificación de flavonoides en chocolate. ....	39
Tabla 11. Identificación de flavanoles. ....	41
Tabla 12. Datos para curva de calibración. ....	42
Tabla 13. Estadístico para la linealidad. ....	43
Tabla 14. Resultados del límite de detección y cuantificación. ....	44
Tabla 15. Resultados estadísticos del parámetro de repetibilidad. ....	45
Tabla 16. Resultados estadísticos del parámetro precisión intermedia. ....	45
Tabla 17. Análisis de varianza de la precisión intermedia. ....	46
Tabla 18. Resultados estadísticos para el parámetro de exactitud. ....	47
Tabla 19. Recuperación aparente y estadísticos para los tres niveles de concentración. ....	47
Tabla 20. Concentración de flavonoides en muestras de semilla cruda. ....	48
Tabla 21. Concentración de flavonoides en muestras de licor. ....	50
Tabla 22. Concentración de flavonoides en muestras de chocolate. ....	51
Tabla 23. Curva de calibración por triplicado. ....	61
Tabla 24. Estimación de mínimos cuadrados para la linealidad. ....	61
Tabla 25. Resultados de blancos. ....	62
Tabla 26. Concentraciones para repetibilidad. ....	64
Tabla 27. Datos para porcentaje de recobro para la repetibilidad. ....	65
Tabla 28. Resultados de dos analistas para cálculo de precisión intermedia. ....	65
Tabla 29. Datos para porcentaje de recobro Analista 1. ....	65

Tabla 30. Datos para porcentaje de recobro Analista 2.....	66
Tabla 31. Absorbancias en tres niveles .....	68
Tabla 32. Datos para cantidad recuperada .....	68
Tabla 33. Datos de intervalos de confianza.....	68
Tabla 34. Concentraciones de muestras en semilla cruda. ....	69
Tabla 35. Análisis de varianza para muestras de semilla en crudo. ....	70
Tabla 36. Información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para semilla cruda. .....	70
Tabla 37. Concentraciones en muestras de licor. ....	71
Tabla 38. Análisis de varianza para muestras de licor. ....	72
Tabla 39. Información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para licor. ....	72
Tabla 40. Concentraciones en muestras de chocolate .....	73
Tabla 41. Análisis de varianza para muestras de chocolate .....	74
Tabla 42. Información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para chocolate. .	74

## 1 INTRODUCCIÓN

Durante muchas décadas se clasificaba el cacao únicamente en tres grupos, criollo, trinitario y forastero. Sin embargo, en la actualidad se cuenta con 10 grandes grupos genéticos los cuales reflejan con mayor precisión la diversidad genética del cacao. (Motamayor et al., 2008)

El grano de cacao contiene cientos de compuestos bioactivos, los cuales varían con factores como la genética, el ambiente, las prácticas agronómicas, las prácticas postcosecha y procesos de industrialización, entre otros. Dentro de los compuestos bioactivos del cacao se encuentran los polifenoles y los más abundantes son los flavonoides. Los flavonoides mayoritarios en el cacao son los llamados flavanoles, entre estos están las catequinas (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%). (Oracz et al., 2015)

Estudios epidemiológicos y clínicos respaldan la evidencia de que los compuestos fenólicos en la dieta mejoran la salud humana al reducir el riesgo y prevenir la aparición de enfermedades degenerativas, incluidos algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos. De igual manera, se asocia con la reducción de la agregación plaquetaria, mejora en la sensibilidad a la insulina, y mejora de la función neuronal y cognitiva. (Osorio et al., 2022)

El tratamiento del grano de cacao durante el proceso de beneficio y su transformación industrial, pueden afectar el contenido de polifenoles y, por tanto, la funcionalidad del grano como agente antioxidante. En etapas como la fermentación y el secado, donde se desarrollan los precursores del aroma y sabor, y en el tostado donde se definen las características organolépticas, se han detectado pérdidas importantes de flavonoides. (Villamil et al., 2009)

El objetivo de la pasantía de investigación fue determinar flavonoides por medio de análisis colorimétricos y espectrofotométrico evaluando cinco diferentes accesiones de *Theobroma cacao* L, determinando si existían variaciones entre estas, así como en sus derivados (licor, chocolate).

La pasantía de investigación brindó un aporte a la línea de investigación de bioprospección de cacao de CENSALUD, la cual tiene una visión multidisciplinaria donde la biología, química y agroindustria son fundamentales. Los resultados del trabajo representan un beneficio para el productor gracias a la caracterización fisicoquímica de sus cultivos dándole un valor agregado a estos. Además, el trabajo realizado durante la pasantía, contribuirá a la creación de un chocolate funcional con características que permitan, beneficiar a la población que padece de afecciones cardiacas, diabetes e hipertensión quienes buscan una alimentación sana, gracias a la generación de derivados funcionales de cacao.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Aplicar métodos colorimétricos para el análisis cualitativo y cuantitativo del contenido de flavonoides en diferentes genotipos de *Theobroma cacao L*, a nivel de semilla cruda y sus derivados (licor y chocolate).

### 2.2 Objetivos específicos

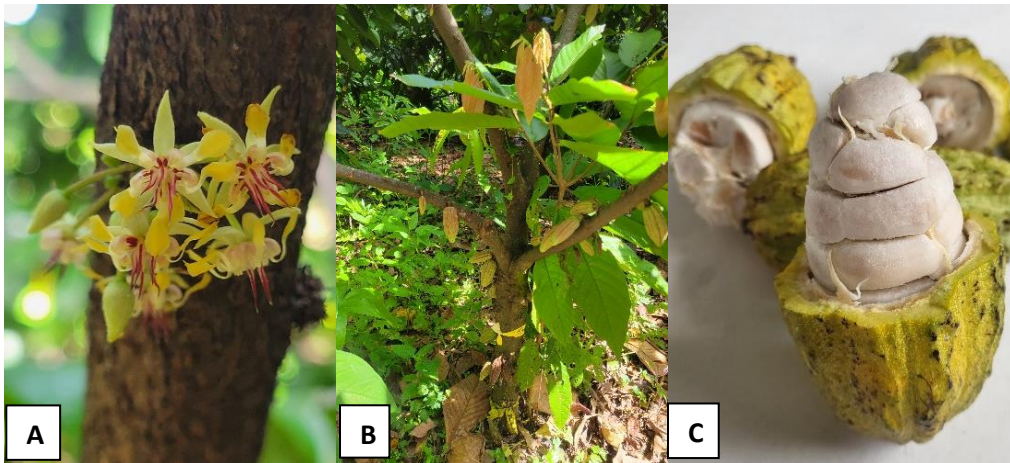
1. Preparar el extracto hidroalcohólico para los análisis, de las semillas crudas de cacao y sus derivados (licor y chocolate) de 5 diferentes genotipos de *Theobroma cacao L*.
2. Aplicar métodos colorimétricos para identificar polifenoles totales, flavonoides y flavanoles en extractos de semillas crudas de cacao y sus derivados (licor y chocolate) en 5 diferentes genotipos.
3. Validar la metodología de tricloruro de aluminio  $AlCl_3$  por espectrofotometría Uv-Vis para determinar flavonoides en semillas crudas de cacao y sus derivados (licor y chocolate) en 5 diferentes genotipos de *Theobroma cacao L*.
4. Comparar si existen diferencias significativas en el contenido de flavonoides de las semillas crudas de cacao y sus derivados (licor y chocolate) en 5 diferentes genotipos de *Theobroma cacao L*.

### 3 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades del cacao.

La clasificación taxonómica actual del cacao es la siguiente: Reino: Plantae, Tipo: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Orden: Malvales, Familia: Malvaceae, Género: Theobroma, Especie: *Theobroma cacao*. El nombre científico es *Theobroma cacao* L.

El árbol de cacao tiene una altura que normalmente alcanza entre 3 a 8 metros y puede llegar a crecer más si se cultiva en condiciones silvestres; produce flores hermafroditas durante todo el año. Los frutos de cacao alcanzan la madurez de 5-6 meses después de que ocurren la polinización y la fertilización, el fruto se llama baya (utilizándose el término de mazorca de cacao comúnmente) y tiene una longitud de 15-30 cm, un diámetro de 8-10 cm y un peso que varía de 200 g a 1 kg. En general, la baya tiene una cáscara dura de unos 10-15 mm de espesor. El fruto alberga un promedio de 30-40 semillas adheridas a una placenta central y sus cotiledones pueden ser blancos o violetas, la variabilidad de las características antes mencionadas depende de diferentes factores como la genética, el ambiente, la edad de los árboles, las prácticas agronómicas, entre otros. (Micheli et al., 2010)



**Figura 1.** Imágenes mostrando características morfológicas del árbol y fruto del cacao. A. cojines florales mostrando flores pentámeras. B. características del árbol nótese la horquilla característica. C. fruto abierto mostrando la disposición de las semillas cubierta por un mucílago blanco.

### 3.2 Genética del cacao.

Desde mediados del siglo XX, las variedades de cacao se han clasificado en tres grupos generales: criollo, forastero y trinitario, según sus descriptores morfológicos y su origen geográfico, las investigaciones realizadas se cree que los criollos fueron los primeros cacaos domesticados por los mayas hace más de 3000 años. (Gamarra et al., 2017)

El cacao criollo comprende árboles delgados; los frutos tienen típicamente una cubierta delgada y escultrada, cotiledones color blancos o amarillentos con mayor susceptibilidad a plagas. (Gamarra et al., 2017)

Por otra parte, los forasteros comprenden los tipos de cacaos establecidos en el alto y bajo amazonas se caracterizan principalmente por su fruto verde, una cubierta del fruto (pericarpo) gruesa, un mesocarpo fuertemente lignificado, semillas redondeadas y ligeramente aplanadas y cotiledones de color violeta. (Gamarra et al., 2017)

Mientras que los trinitarios son un grupo de origen híbrido; entre criollos y forasteros procedentes de la Isla de Trinidad, es un grupo muy heterogéneo genéticamente y morfológicamente, muy polimorfo, no siendo posible delimitarlo a través de características comunes.(Gamarra et al., 2017)

Sin embargo, en la actualidad existen nuevas propuestas de clasificaciones del cacao (Motamayor et al., 2008), que consisten en la generación de diez grandes grupos o “clúster” estos son: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional y Guayana. Esta nueva clasificación refleja con mayor precisión la diversidad genética del cacao.

### 3.3 Composición química de la semilla de cacao.

Según Torres, 2012, “La composición de la semilla del cacao depende de factores como el genotipo o las condiciones de crecimiento del árbol, características del suelo, clima, horas de insolación, entre otros.” Los principales constituyentes químicos de la semilla de cacao son: agua, ácidos grasos, proteínas, fibras, vitaminas y minerales, así como alcaloides y polifenoles.

**Tabla 1.** Principales constituyentes químicos de la semilla de cacao.

<b>Componente</b>	<b>%</b>	<b>Componente</b>	<b>%</b>
Humedad	5-8	Theobromina	0.8-2
Lípidos	48-57	Catequina	37

Proteína	17.5	Antocianinas	4
Fibra	15-20	Proantocianidinas	58

El grano contiene un pequeño porcentaje de humedad de 5-8%. Por otra parte, la fracción lipídica del grano es del 48 al 57% y se le conoce como manteca de cacao en donde los ácidos grasos (AG) predominantes son los saturados, el segundo componente más abundante del grano de cacao son las proteínas y suponen un 17.5%. (Torres, 2012)

Así mismo la semilla de cacao no procesada es una buena fuente de fibra, principalmente insoluble del 15-20% de peso de la semilla, a su vez contiene minerales que siguen estando presentes en altas concentraciones en los subproductos del cacao. (Torres, 2012)

Por otro lado, el cacao presenta también un contenido considerable en alcaloides de tipo base púrica, de la familia de las metilxantinas (teobromina, cafeína y teofilina), compuestos que le confieren un pequeño poder estimulante. El alcaloide mayoritario es la teobromina y presenta entre el 0.8 y el 2% del contenido total de los granos de cacao. (Torres, 2012)

Además, el cacao es rico en compuestos polifenólicos los cuales se encuentran almacenados en células distribuidas en los cotiledones, el grupo más abundante son los flavonoides, especialmente tres grupos básicos con un núcleo común tipo flavan-3-ol: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). De este grupo de compuestos, los más frecuentes en los granos de cacao son los dímeros de procianidinas de bajo peso molecular (procianidina B1, procianidina B2), trímeros (procianidina C1), tetrámeros (procianidina D), oligómeros más grandes y polímeros. Los taninos insolubles y solubles son responsable de la astringencia y amargor característicos del grano recién cosechado. Esto se debe a la capacidad de los taninos para formar complejos con proteínas. (Oracz et al., 2015)

Según Martín & Ramos, 2016, “la variación de estos compuestos polifenólicos varía según su origen, genética y condiciones de cultivo”. Las antocianinas son responsables del color púrpura típico de los granos sin fermentar y, durante la fermentación del grano, las antocianinas se hidrolizan en un azúcar y cianidina, lo que resulta en un contenido reducido de antocianinas. (Cáceres et al., 2022)

### **3.4 Los polifenoles.**

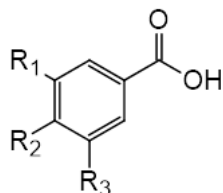
Los polifenoles son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos de benceno, son productos del metabolismo secundario de las plantas y biogénicamente surgen a partir de dos principales rutas sintéticas: la vía de shikimato y acetato. Sus funciones fisiológicas están relacionadas con la protección frente a la radiación UV y a las condiciones de estrés biótico como herbivoría, infección, parasitismo y patogénesis de las plantas. (Andres et al., 2012)

El contenido de polifenoles en vegetales varía con las condiciones de crecimiento y los estímulos ambientales; difiere también de una especie a otra, y de un tejido a otro, encontrándose principalmente en frutas, donde el grado de madurez e incluso el manejo postcosecha de los mismos afectan el contenido de éstos, suelen encontrarse como ésteres o glucósidos en lugar de compuestos libres. (Andres et al., 2012)

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos y flavonoides, siendo estos últimos de gran importancia. (Quiñones et al., 2004)

## POLIFENOLES

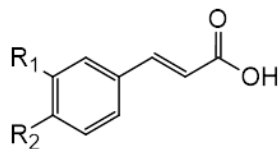
### Ácidos Hidroxibenzoico



$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$     Ácido protocateico

$R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$     Ácido gálico

### Ácidos Hidroxiácido

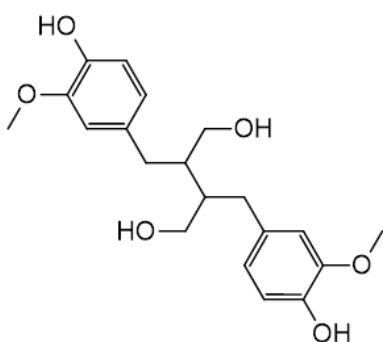


$R_1 = \text{OH}$     Ácido cumárico

$R_1 = R_2 = \text{OH}$     Ácido caféico

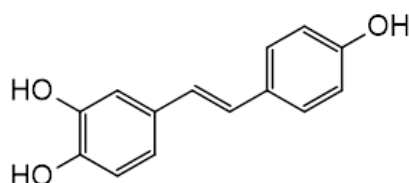
$R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$     Ácido férulico

### Lignanós



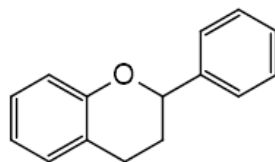
Secoisalariquina

### Estilbenos



Resveratrol

### Flavonoides

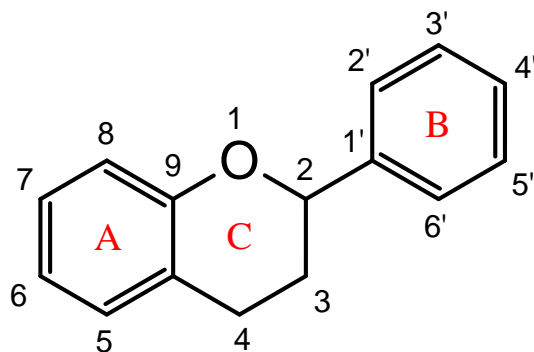


Se señalan los sustituyentes que corresponden a la estructura concreta de algunos compuestos. Tomado de (Quiñones et al., 2004).

**Figura 2.** Clasificación de los principales grupos de polifenoles y se añaden ejemplos característicos de cada grupo. Tomado de (Quiñones et al., 2004).

### 3.4.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B. (Vermerris & Nicholson, 2008)

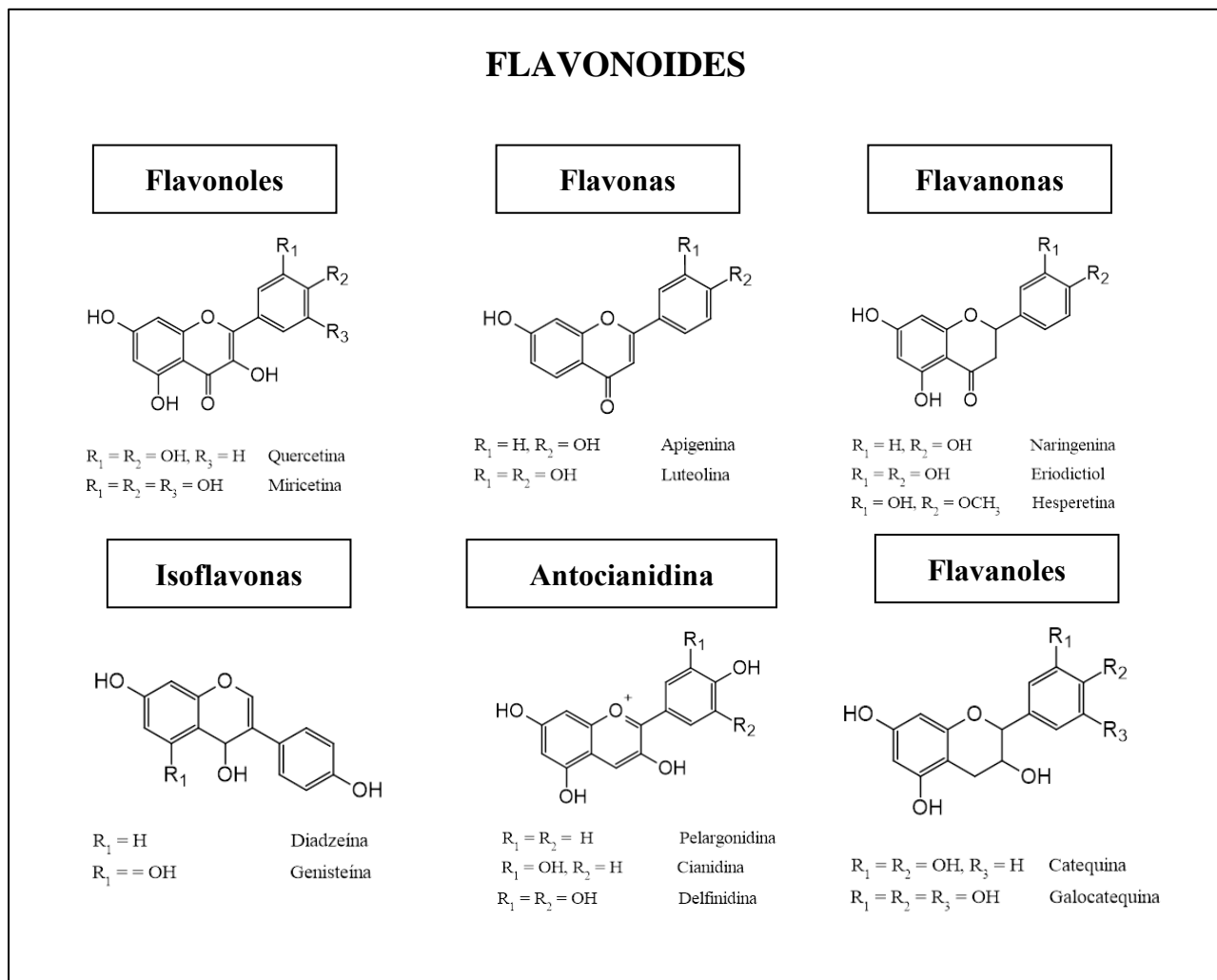


**Figura 3.** Esqueleto común de algunos flavonoides. Tomado de (Quiñones et al., 2004)

Existen varios subgrupos de flavonoides. La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles.

Los flavonoides son fitonutrientes y se encuentran no solo en las plantas sino en algunas frutas, verduras y otros alimentos, tal es el caso del té y el vino que son ricos en flavonoles siendo la quercetina el más representativo de este grupo, las flavanonas aparecen en altas concentraciones en cítricos y tomates siendo la naringenina la mayoritaria, mientras que las isoflavonas se clasifican como fitoestrógenos y se encuentran exclusivamente en plantas leguminosas como la soja, por otra parte están las antocianidinas que constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales, están presentes en el vino tinto algunos cereales, frutas y verduras y por último, los flavanoles más representativo en alimentos son del tipo flavan-3-ol y estos pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (prociánidinas), o bien, pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados), siendo la

epicatequina y catequina los compuestos mayoritarios en frutas. Las catequinas también se encuentran en el vino y en el chocolate. (Sucasaca et al., 2021)



**Figura 4.** Principales grupos de flavonoides con ejemplos característicos de cada grupo. Tomado de (Quiñones et al., 2004).

### **3.5 Efectos del cacao en la salud.**

En los últimos años diversos autores han demostrado que el cacao y sus derivados tienen propiedades antioxidantes. (Villamil et al., 2009). Según Higginbotham & Taub, 2015, en estudios epidemiológicos y clínicos han vinculado el cacao con numerosos beneficios cardiovasculares. Varios datos de estudios a gran escala muestran que existe una relación inversa entre el consumo de chocolate negro y cacao y el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, los flavonoides del cacao pueden actuar como agentes antidiabéticos directos al mejorar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, entre otras acciones en el páncreas, hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. (Martín et al., 2008)

Entre los hallazgos más recientes están los reportados por los investigadores de la Universidad de Harvard quienes afirman que los indios Kuna de Panamá presentan bajos niveles de enfermedades cardiovasculares, coronarias, cáncer y diabetes, debido a su alto consumo de chocolate. (Bayard et al., 2007)

### **3.6 El cacao como fuente de polifenoles.**

El cacao es una gran fuente de polifenoles y específicamente flavonoides, contiene especialmente tres grupos básicos con un núcleo común tipo flavanol: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). (Martín & Ramos, 2016)

El contenido de polifenoles se relaciona con la variedad del cacao, lugar de producción y origen geográfico; pero también existen elementos externos que inciden en el contenido de polifenoles, como factores ambientales y agronómicos. Se ha demostrado que la concentración de polifenoles en el cacao varía con respecto al genotipo; La variedad tipo criollo posee menos contenido de polifenoles, oscilando entre 4 y 5 g/100 g de semilla peso seco. El tipo trinitario ha mostrado contenido de 6.4 g/100 g de semilla peso seco y el tipo Forastero con niveles más elevados que oscilan entre 7.2 y 8.2 g/100 g de semilla peso seco. (Andres et al., 2012)

Otro elemento que afecta el contenido de polifenoles es el proceso de transformación del cacao, en los granos crudos sin fermentar se encuentran altos niveles de flavonoides que disminuyen drásticamente durante la fermentación, el tostado y la alcalinización. La fermentación es esencial para el desarrollo de aromas deseables y precursores de sabor. Sin embargo, más del 80% de la

catequina y epicatequina se pierden en este proceso, y durante el tostado, se produce una pérdida del 14% del contenido fenólico total. (Osorio et al., 2022)

Es decir que las concentraciones de flavonoides en los derivados del cacao como lo son licor y chocolate son menores respecto al contenido de las semillas crudas sin fermentar.

### **3.7 Procesos de Industrialización y Biocompuestos.**

La industrialización del cacao implica varios procesos desde la recolección de las bayas hasta la elaboración de productos finales como el chocolate. Estos procesos incluyen la fermentación, el secado, el tostado, la molienda, y la refinación para obtener productos como la pasta (licor) de cacao, la manteca de cacao.

#### **3.7.1 Licor de cacao.**

El licor de cacao es el producto intermedio más importante en la industria del cacao. Dicho licor está hecho de granos seleccionados, que son tostados, descascarillados, molidos y refinados. Esto implica una desintegración física para la reducción de tamaño y estas tareas afectan la composición de los biocompuestos de acuerdo con los estudios reportados. Existe una reducción significativa en el contenido total de polifenoles cuando los granos se tostan (p. ej., en el licor de cacao), lo cual es causado por procesos como la precipitación de polifenoles después de la interacción con proteínas, polimerización o hidrólisis, la epimerización de la epicatequina a catequina y reacción de Maillard. (Gil et al., 2021).

#### **3.7.2 Chocolate.**

La variación de polifenoles en chocolate depende de factores como lo reporta, Gil et al., 2021:

- Los pasos de producción del chocolate, dado que el tostado, la alcalinización y el prensado son los más críticos en la reducción de polifenoles (debido a la polimerización e hidrólisis, así como interacciones proteicas y reacciones de Maillard).
- La cantidad de cacao presente en el chocolate.
- El tiempo y temperatura del procesamiento.

### 3.8 Métodos colorimétricos para determinar flavonoides.

El análisis colorimétrico es una técnica analítica que se utiliza para medir la concentración de una sustancia química en una muestra a través de la medición del color que se produce durante una reacción química específica.

#### 3.8.1 Análisis fitoquímico para polifenoles.

Los polifenoles y sus diversos grupos se pueden identificar cualitativamente a partir de ensayos colorimétricos como son:

**Ensayo de Folin-Ciocalteu:** Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible, mientras la coloración es más intensa es indicativo de mayor concentración de polifenoles totales. (Martínez & López, n.d.)

La figura 5 representa el mecanismo de acción para polifenoles totales en donde reactivo principal consiste en una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo, mediante una reacción de tipo óxido/reducción en medio básico se forma el complejo Mo(V) de coloración azul.

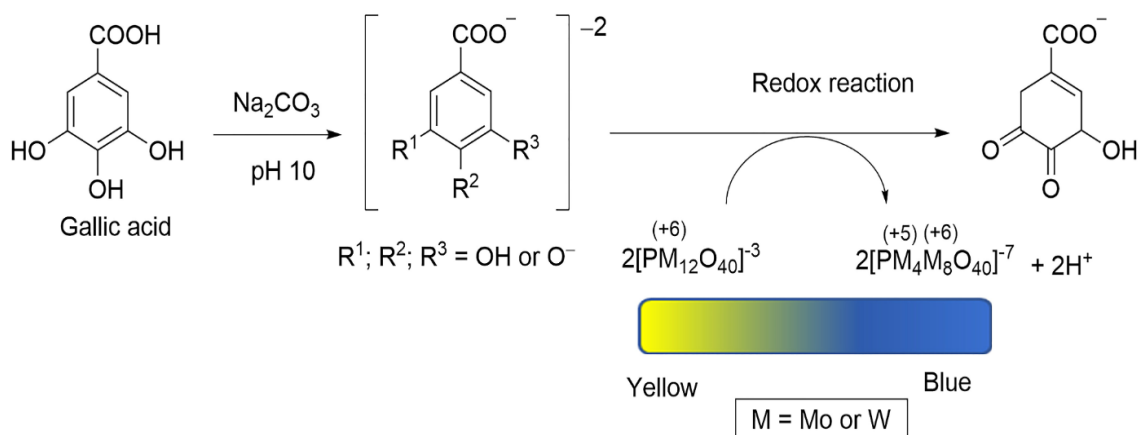
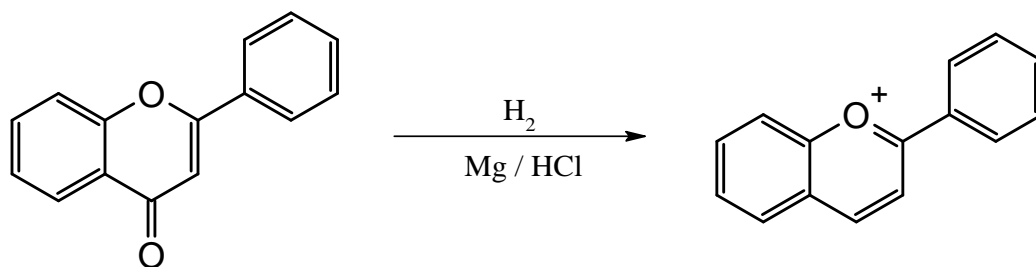


Figura 5. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu

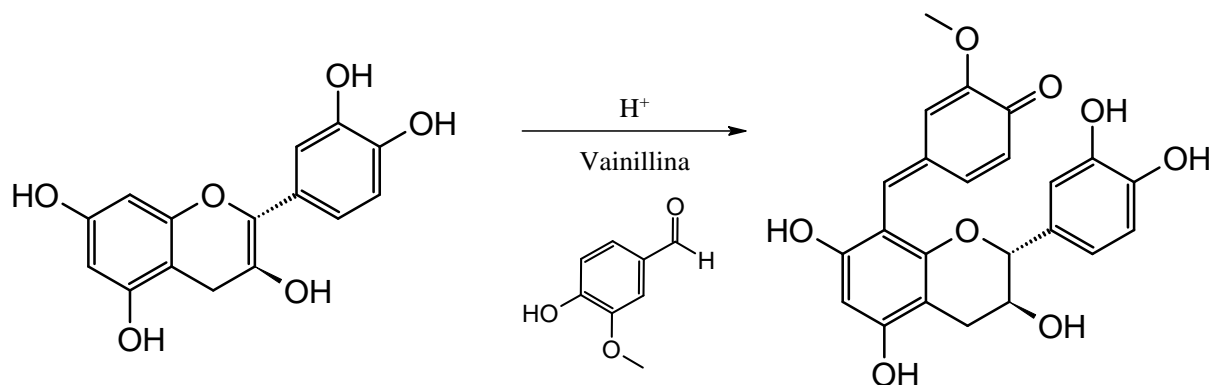
**Ensayo de Shinoda:** Es específico para flavonoides, en la reacción de Shinoda, el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos el  $\text{H}_2$ , que es eliminado en forma de gas y el  $\text{MgCl}_2$ , es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. (Fajardo et al., 2016)



**Figura 6.** Reacción del ensayo de Shinoda.

El ensayo de Shinoda da coloraciones diferentes dependiendo del tipo de flavonoide que sea, los flavanoles y flavonas dan coloración del amarillo a rojo, las isoflavonas dan amarillo, mientras las flavanonas van de azul magenta, violeta y rojo y finalmente las flavanoles de rojo a magenta. (Sucasaca et al., 2021)

**Ensayo de vainillina/HCl:** es una reacción específica para flavanoles ya que cualquier monómero de flavanol apropiadamente sustituido reacciona en este ensayo, dando una coloración roja cuando la vainillina reacciona con el anillo metasustituido de flavonoides (Hagerman, 2002.)



**Figura 7.** Reacción del ensayo de Vainillina/HCl

### 3.8.2 Determinación cuantitativa de flavonoides.

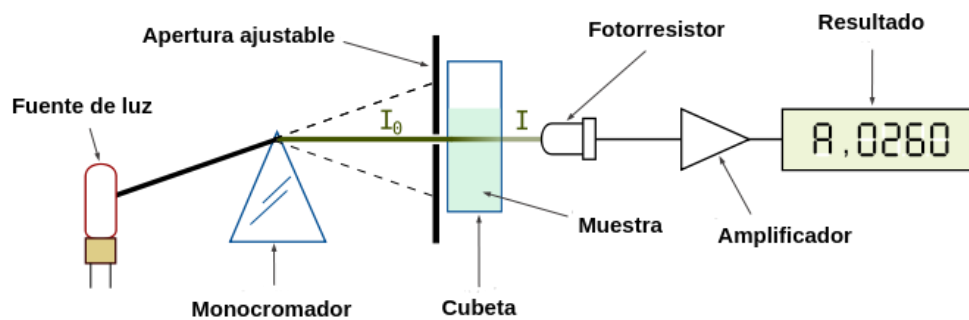
Los flavonoides se pueden cuantificar por medio de espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), métodos cromatógrafos como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y por el método de espectrofotometría ultravioleta visible (Uv-Vis) (Castellanos, 2016). Para fines de esta investigación se utilizó el método de  $\text{AlCl}_3$  por espectrofotometría Uv-Vis propuesto por Woisky y Salatino en 1998. (Hamasaka et al., 2004)

La espectrofotometría Uv-Vis es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Esta técnica mide la cantidad de luz absorbida por una muestra a

diferentes longitudes de onda, lo que permite identificar y cuantificar sustancias. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. (Díaz et al., n.d.)

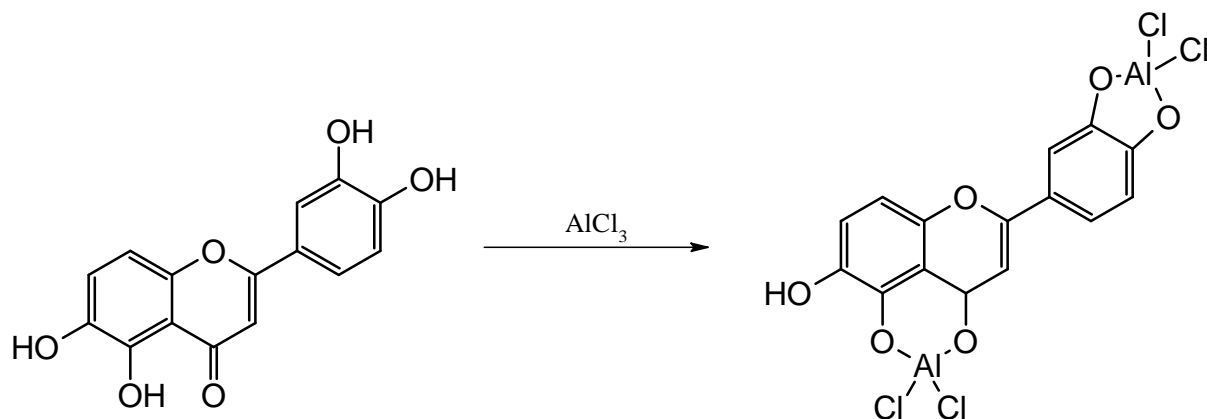
Un espectrofotómetro está formado por los siguientes componentes:

1. Una fuente de luz.
2. Un monocromador para la selección de longitud de onda.
3. Una celda o cubeta para la muestra.
4. Un detector para medir la intensidad de la luz transmitida.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos.



**Figura 8.** Proceso de detección de una muestra en espectrofotometría UV-Vis y sus componentes.

El principio del método de tricloruro de aluminio  $AlCl_3$  es que la adición de una disolución acuosa de tricloruro de aluminio con una concentración al 2%, con la cual se forma un complejo ácido estable con grupos cetona C-4, así como en grupos hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoides como en la Figura 9. El  $AlCl_3$  también forma complejos ácidos estables con el grupo ortodihidroxilo en el anillo A o B de los compuestos flavonoides tienen una absorción máxima a una longitud de onda de 432 nm. (Makuasa & Nigsh, 2020)



**Figura 9.** Complejo metálico da coloración amarilla cuando se utiliza la quercetina como estándar. Tomado de (García,2014)

### 3.9 Validación del método analítico.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos o parámetros definidos y para el propósito requerido.(OSA,2017)

Para la validación del método espectrofotométrico se tomaron en cuenta los parámetros de linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud y límite de detección y límite de cuantificación, siguiendo los criterios de aceptación establecidos por la validación de métodos analíticos fisicoquímicos del OSA.

#### 3.9.1 Parámetros de validación:

- a) **Linealidad:** Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito. Se deduce que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.

#### Criterios de aceptación Intervalo lineal

- Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica.
- Datos aleatorios en el gráfico de residuales.
- El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero, cuando se incluyan concentraciones bajas en la curva.

**b) Exactitud:** Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado.

**Criterios de aceptación.**

-Reportar el intervalo de confianza del porcentaje de recobro.

**c) Precisión intermedia:** La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio en: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo.

**Criterios de aceptación.**

-Determinar el coeficiente de variación porcentual o el porcentaje de recobro obtenido.

- Determinar el ANOVA de los datos.

**d) Repetibilidad:** Precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

**Criterios de aceptación.**

-Determinar el coeficiente de variación porcentual o el porcentaje de recobro obtenido.

**e) Límite de detección:** El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable o la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Se usará la fórmula:  $LOD = \frac{3.3 * Sb}{m}$

**f) Límite de cuantificación:** La menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptable bajo las condiciones establecidas de la prueba.

Se usará la fórmula:  $LOQ = \frac{10 * Sb}{m}$

## 4 METODOLOGÍA

### 4.1 Descripción del estudio.

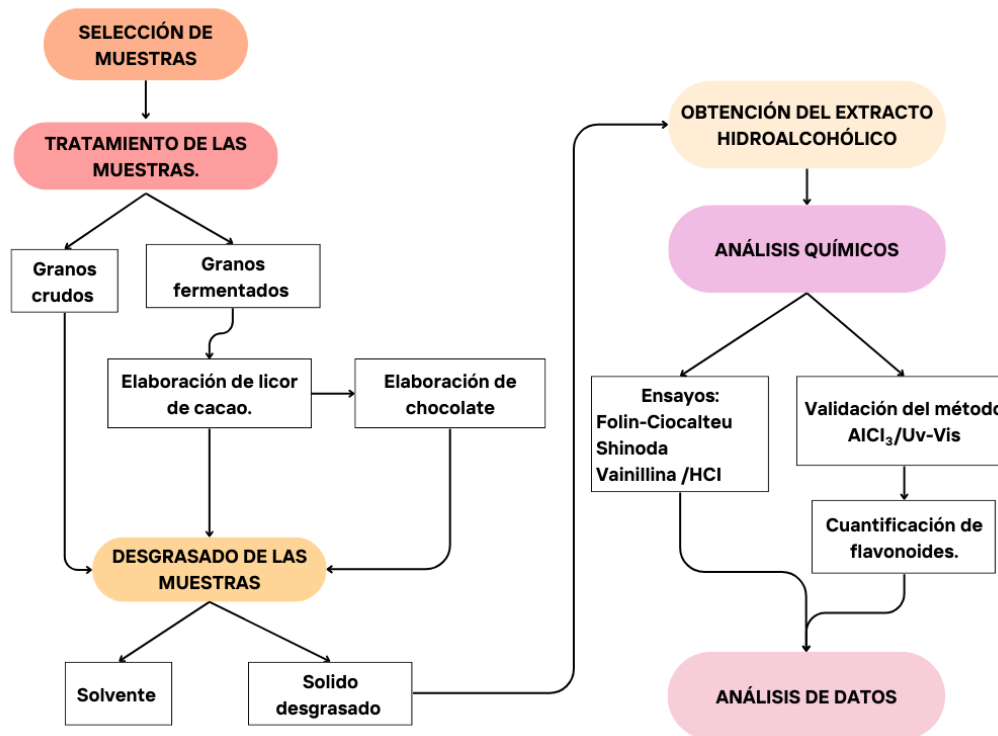
La pasantía de investigación fue ejecutada en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, ubicado en Ciudad Universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, Final de Av. Mártires y Héroes del 30 de julio, San Salvador, El Salvador, América Central. Está contemplada dentro de la línea de investigación Bioprospección del cacao salvadoreño en el Área de Seguridad Alimentaria y Nutricional de la agenda de investigación de CENSALUD.

La pasantía inició con la recepción de muestras de frutos de accesiones de los genotipos de cacao seleccionados a los cuales se les realizaron los ensayos fitoquímicos a partir de métodos colorimétricos, como fueron los ensayos de: Folin-Ciocalteu, Shinoda y Vainillina/HCl; para determinar cualitativamente el contenido de polifenoles totales, flavonoides y flavanoles en las diferentes accesiones de *Theobroma cacao L* seleccionadas.

La segunda etapa de la pasantía consistió en la validación del método colorimétrico de tricloruro de aluminio por espectrofotometría Uv-Vis para cuantificar flavonoides presentes en las muestras seleccionadas de semillas crudas y sus derivados (licor y chocolate) y se finalizó con el análisis de los datos para así comparar la variación entre los diferentes genotipos y derivados de cacao.

### 4.2 Metodología Experimental.

La metodología de laboratorio inicio con la recepción de los frutos tomándose una muestra de semillas crudas para su análisis químico; y el resto procesado en el laboratorio de control de calidad y chocolate, para su transformación a licor y chocolate. Las semillas crudas se procesaron obteniéndose el extracto hidroalcohólico, para realizar los análisis colorimétricos: ensayo de Folin-Ciocalteu para polifenoles totales, Shinoda para flavonoides y Vainillina/HCl para flavanoles, y posterior validación del método espectrofotométrico de  $AlCl_3$  para determinar flavonoides, con los resultados obtenidos se realizó el análisis estadístico, la Figura 10, representa en forma de diagrama cada etapa de la metodología de laboratorio.



**Figura 10.** Diagrama de la metodología de laboratorio. Fuente: Propia.

Los materias, reactivos y equipos utilizados para el desarrollo de la metodología de laboratorio se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Materiales, reactivos y equipos.

REACTIVOS	MATERIAL	EQUIPOS
Ácido clorhídrico	Beakers	Espectrofotómetro UV-Vis (UV-Mini 1240, SHIMADZU)
Metanol	Probetas	Centrífuga (ORTO ALRESA)
Etanol	Tubos de ensayo	Rotavapor Heidolph
Éter de petróleo	Balones Volumétrico	Molino Pequeño
Alcohol amílico	Viales	Hot-Plate

Vainillina	Goteros	Incubadora Precisión
Cinta de magnesio metálico	Tubos falcon	Refrigerador Thermo Scientific -20°C
Carbonato de sodio	Vidrios de reloj	Mezclador Vortex
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Buretas	Balanza Analítica (Sartorius)
Tricloruro de Aluminio	Pipetas	
Ácido Gálico		
Quercetina		

#### 4.2.1 Selección de muestras.

Las cinco muestras seleccionadas son procedentes de fincas elites evaluadas genéticamente dentro de la línea de investigación de bioprospección del cacao salvadoreño.

Se realizó la colección de 20 a 30 mazorcas de cada genética provenientes de las 5 fincas elites ubicadas en la zona central y occidental del país, los frutos fueron llevados al laboratorio de control de calidad de cacao y chocolate de CENSALUD, donde cada mazorca fue cortada para obtener la pulpa y realizar el respectivo tratamiento de las muestras.

Las siguientes figuras representan las diferentes accesiones analizadas.

**Muestra: GEN-C**

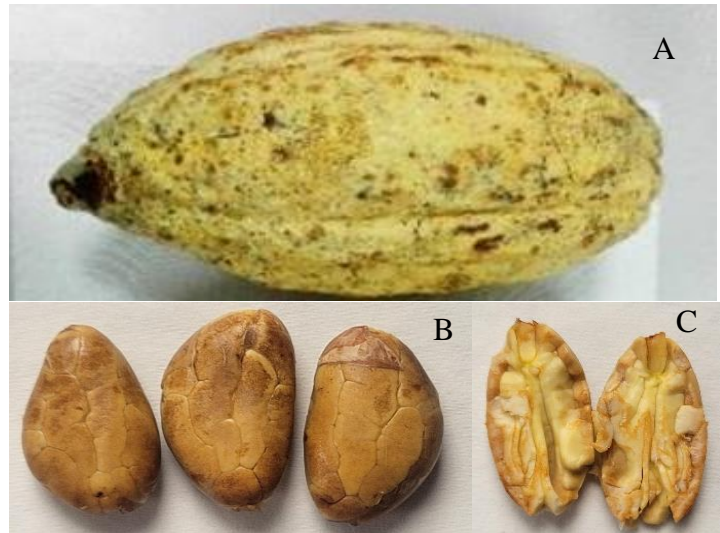
**Grupo genético: Criollo**

**Descriptores morfológicos:**

**Forma básica del fruto: Anjoleta**

**Forma de semilla: Piramidal**

**Color de cotiledones: Crema**



**Figura 11.** Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia.

**Muestra: GEN-CM**

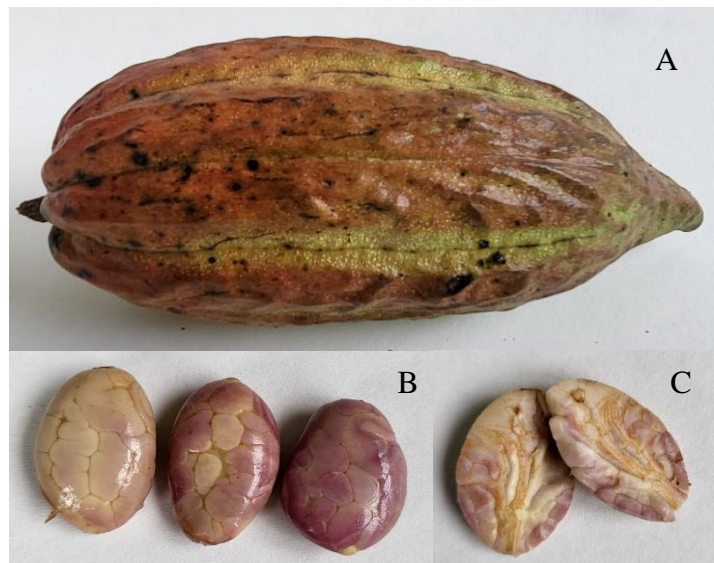
**Grupo genético: Híbrido (Criollo moderno)**

**Descriptores morfológicos:**

**Forma básica del fruto: Anjoleta con ápice acuminado.**

**Forma de semilla: Ovada**

**Color de cotiledones: Jaspeado (mezcla de color crema y violeta claro)**



**Figura 12.** Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia.

**Muestra: GEN-H1.**

**Grupo genético: Híbrido**

**Descriptores morfológicos:**

**Forma básica del fruto: Angoleta**  
con ápice caudado.

**Forma de semilla: Ovada**

**Color de cotiledones: Violeta**  
intenso



**Figura 13.** Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia.

**Muestra: GEN-H2**

**Grupo genético: Híbrido**

**Descriptores morfológicos:**

**Forma básica del fruto: Angoleta**  
con ápice caudado

**Forma de semilla: Ovada**

**Color de cotiledones: Violeta**



**Figura 14.** Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia.

**Muestra: GEN-H3.**

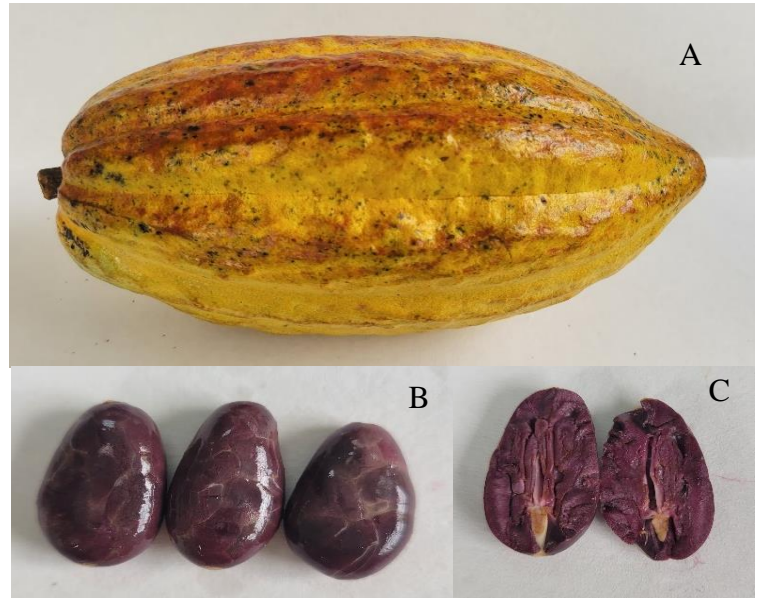
**Grupo genético: Híbrido**

**Descriptores morfológicos:**

**Forma básica del fruto: Elíptica**

**Forma de semilla: Elíptica**

**Color de cotiledones: Violeta**



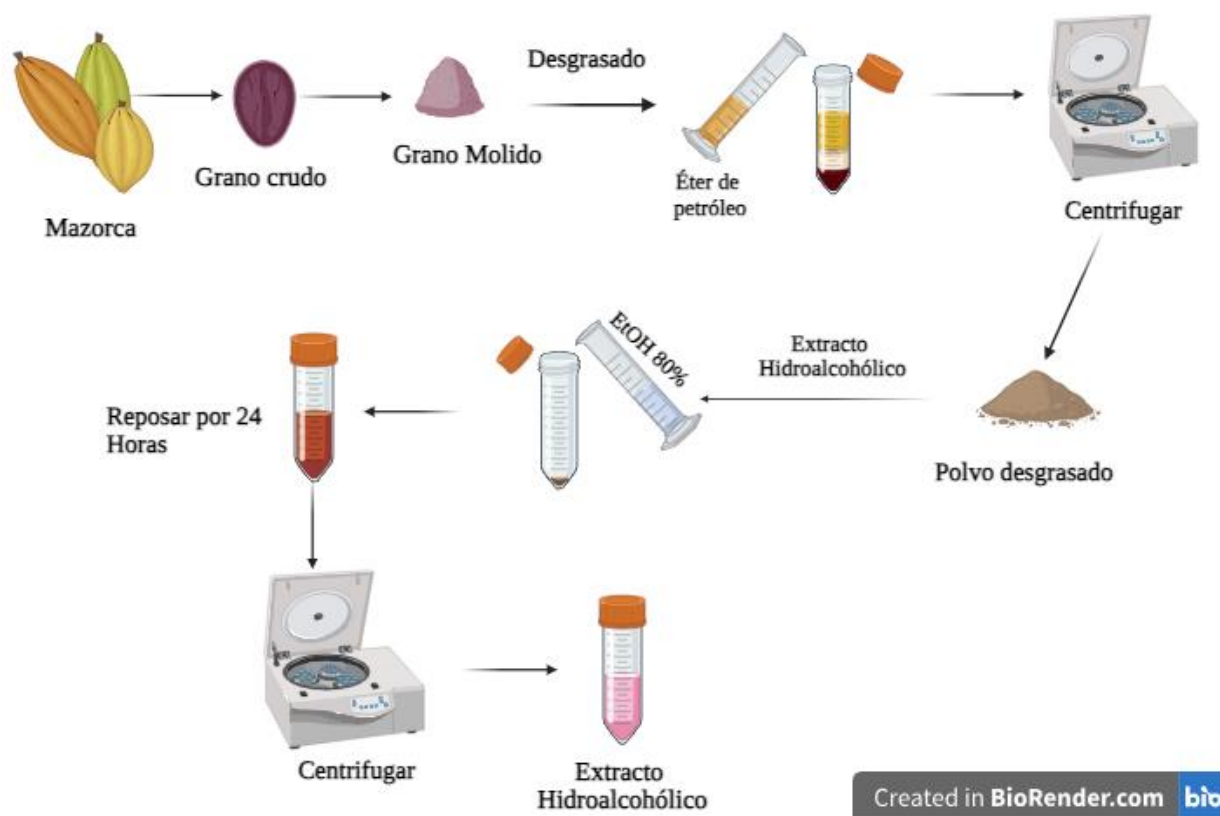
**Figura 15.** Baya de cacao (A), Semillas de cacao (B), Semilla en corte longitudinal (C), nótese color de cotiledón. Fuente: propia.

## 4.2.2 Tratamiento de las muestras.

Se rotularon las muestras como, GEN-C, GEN-CM, GEN-H1, GEN-H2 Y GEN-H3 para las 5 muestras de genotipos diferentes, tanto para semillas crudas, licor y chocolate.

### 4.2.2.1 Granos crudos

Los granos de cacao crudos fueron obtenidos de los frutos de cacao, a los cuales se les removi6 la pulpa para obtener los granos limpios, estos fueron triturados en un molino peque1o, el s6lido posteriormente fue desgrasado y luego se obtuvo el extracto hidroalcoh6lico que se utiliz6 para los an6lisis colorim6tricos, tal como se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Esquema de tratamiento de las muestras de semillas crudas. Fuente: Propia

#### **4.2.2.2 Licor.**

Las semillas frescas de cacao fueron llevados al laboratorio de control de calidad de cacao y chocolate de CENSALUD, donde fueron procesados hasta la obtención del licor de cada uno de los 5 genotipos, siguiendo el protocolo de la guía para la evaluación de la calidad y el sabor del cacao (Cacao de Excelencia, 2024) , una parte del licor fue utilizado para la evaluación del contenido de flavonoides, este fue desgrasado y luego se obtuvo el extracto hidroalcohólico, el resto del licor fue utilizado para la elaboración del chocolate.

#### **4.2.2.3 Chocolate.**

En el laboratorio de control de calidad de cacao y chocolate de CENSALUD, a partir de licor previamente hecho fue elaborado el chocolate al 70% de cada una de las 5 muestras, siguiendo el protocolo de la guía para la evaluación de la calidad y el sabor del cacao (Cacao de Excelencia, 2024), parte del chocolate fue desgrasado y luego se obtuvo el extracto hidroalcohólico para los análisis colorimétricos.

#### **4.2.3 Desgrasado de las muestras.**

El contenido de grasa presente en los granos de cacao afecta en la medición del contenido de polifenoles, demostrándose que al ser desgrasado aumenta el contenido de estos biocompuestos según lo reportado por Castro et al., 2017, por esta razón fue importante iniciar el tratamiento de las muestras con el desgrasado.

Para el desgrasado de las muestras se siguió el protocolo descrito por Suazo et al., 2014 con algunas modificaciones.

- Se colocaron 2 g de muestra (semilla cruda, licor o chocolate) en un tubo falcon de 50 mL, se mezclaron con 10 mL de éter de petróleo y se agitó durante 1 min en un equipo Vortex.
- Seguidamente, la mezcla se centrifugó a 3500 rpm, durante 30 min, haciendo uso de la centrífuga ORTO ALRESA.
- Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el polvo de muestra desgrasado; dejándolo reposar durante 24 h en un ambiente oscuro para eliminar el solvente y evitar la degradación por la luz.

#### **4.2.4 Obtención del extracto hidroalcohólico**

Se obtuvo el extracto hidroalcohólico siguiendo la metodología propuesta por Otálvaro, 2021.

- Se pesó en una balanza analítica 1.0 gramo de muestra desgrasada.
- Se colocó el gramo de muestra en un tubo falcon de 50 mL de capacidad.
- Posteriormente se midieron 10 mL del solvente (etanol/agua, 80:20 v/v) y se agregaron al tubo falcon.
- Se agitó en un vortex durante 1 minuto y luego se rotuló el tubo con el nombre de la muestra y la hora de la preparación del extracto.
- Se dejó reposar por 24 horas en un lugar oscuro.
- Pasado el tiempo se centrifugó el extracto obtenido durante 30 minutos a 3500 rpm.
- Finalmente se filtró el extracto y guardó a -20°C, hasta que se utilizó.

#### **4.2.5 Análisis Fitoquímicos.**

Cada una de las muestras de semillas crudas, licor y chocolate, previamente tratadas fueron sometidas a tres análisis para determinar presencia o ausencia de polifenoles totales y sus grupos específicos como son flavonoides y flavanoles.

##### **4.2.5.1 Ensayo de Folin-Ciocalteu**

- Se agregó a un tubo de ensayo 0.5 ml del extracto hidroalcohólico seguido de 0.5 mL de agua destilada.
- Posteriormente se agregaron 3 gotas de reactivo de Folin-Ciocalteu en relación 1:9 v/v.
- Luego se añadieron 3 gotas de carbonato de sodio al 15 % y se dejó reposar durante 10 min.
- Finalmente se comparó la intensidad de las coloraciones en las muestras.

##### **4.2.5.2 Ensayo de Shinoda.**

- Se agregó 1 mL del extracto hidroalcohólico a un tubo de ensayo.
- Posteriormente se agregó, 1 mL de HCl concentrado y 6 mg de cinta de magnesio metálico (Reacción exotérmica).
- Seguido se agregó de 1 mL de alcohol amílico.
- Se observó la coloración de las muestras.

#### 4.2.5.3 Ensayo de Vainillina/HCl

- Se agregó a un tubo de ensayo 1 mL del extracto hidroalcohólico.
- Seguido de 0.5 mL de Vainillina 1% en metanol.
- Posteriormente se agregó 0.5 ml de HCl 8% en metanol.
- Se colocó el tubo de ensayo en un baño maría a 30°C durante 10 min.
- Se observaron las coloraciones de las muestras.

Con el fin de obtener confirmación de las pruebas fitoquímicas se utilizó el modelo del selector de color (Imagen Color Picker, s.f.), creando así una paleta de colores para las pruebas colorimétricas específicamente para el análisis de flavonoides.

#### 4.2.6 Determinación de flavonoides por el método de $AlCl_3$

El contenido de flavonoides se determinó con el método de espectrofotométrico de tricloruro de aluminio, utilizando como estándar la quercetina (Q), los resultados fueron expresados como mg Q/g equivalentes a quercetina por gramo de polvo de cacao.(Hamasaka et al., 2004)

##### 4.2.6.1 Validación del método analítico.

Para la validación del método se siguieron los parámetros establecidos y los criterios de aceptación en el sistema de gestión de calidad del OSA G.9.6 2017.

##### Disolución patrón de quercetina de 100 mg/L:

- Se pesó 0.100 g de quercetina y se diluyó en etanol al 80% hasta un volumen de 1000.0 mL
- Se prepararon las disoluciones patrón, de concentraciones 0.5, 2.5, 10, 50 y 80 mg/L, equivalentes de quercetina y aforaron con etanol al 80% en balones de 25 mL.

**Tabla 3.** Esquema de la preparación de las disoluciones patrón que se utilizaron para obtener la recta de calibración.

Concentración de quercetina en el patrón mg/L.	mL a añadir de la disolución patrón de quercetina mL
0.5	0.125
2.5	0.625

10	2.5
50	12.5
80	20.0

▪ **Determinación de linealidad:**

- Se preparó una solución estándar a una concentración de 100 mg /L y partiendo de ésta se elaboraron cinco diluciones de concentraciones conocidas según indica la tabla 2.
- Cada una de estas soluciones incluyendo el blanco se agregaron en un vial de 4 mL de capacidad, adicionándose 1 mL del patrón de quercetina correspondiente y 1 mL de AlCl<sub>3</sub> 2%, se dejaron reposar durante 60 min.
- Pasado el tiempo se midieron las muestras en el espectrofotómetro UV-Mini 1240, SHIMADZU, a una longitud de onda de 420 nm.

Para procesar los datos se elaboró una curva de calibración de la concentración medida contra concentración resultado, se calculó por medio de fórmulas y por el método de estimación por mínimos cuadrados el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada al origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el intervalo de confianza de la pendiente ( $IC_{(\beta_1)}$ ) y el intervalo de confianza para la ordenada al origen ( $IC_{(\beta_0)}$ ), siguiendo las fórmulas del Anexo N°1.

Para la aceptación del intervalo lineal se evaluaron:

- Comportamiento lineal en la gráfica de concentración versus respuesta analítica.
- El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero, cuando se incluyan concentraciones bajas en la curva.
- El coeficiente de correlación de Pearson  $r \geq 0.98$
- El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unida
- Los residuales no deben mostrar tendencia.

▪ **Determinación de límite de detección y cuantificación:**

Para la medición de este parámetro se utilizó la medición de 10 blancos a los cuales se les midió las absorbancias y a partir de ellas se determinó el límite de detección y límite de cuantificación a partir de las fórmulas mostradas en el Anexo 2.

▪ **Determinación de la precisión:**

La precisión es medida en tres parámetros repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad para efecto de la investigación solamente se realizó en dos, repetibilidad y precisión intermedia. Para la repetibilidad se utilizaron tres niveles de concentración bajo (2.5 mg/L), medio (10 mg/L) y alto (80 mg/L).

- Se preparó una solución estándar a una concentración de 100 mg /L, partiendo de esta se elaboraron las disoluciones de 2.5,10 y 80 mg/L.
- Se tomó 1 mL de la disolución y se agregó en un vial de 4 mL de capacidad, seguido de 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  2%, esto se dejó reposar durante 60 min, se realizó por sextuplicado para cada nivel de concentración.
- Pasado el tiempo se midieron las muestras en el espectrofotómetro UV-Mini 1240, SHIMADZU, a una longitud de onda de 420 nm.

El análisis para evaluar la repetibilidad del método se realizó calculando el coeficiente de variación porcentual (CV%) para cada nivel. (ver Anexo N° 3).

El criterio de aceptación consistió en:

- Coeficiente de variación: < 7.3 %

Para la precisión intermedia se requirió de un análisis para determinar si existe una desigualdad significativa con respecto a las varianzas de las mediciones de muestras entre analistas manteniendo las condiciones del día, instrumento y área de análisis. Se utilizaron tres niveles de concentración bajo (2.5 mg/L), medio (10 mg/L) y alto (80 mg/L), con 10 repeticiones por cada nivel.

El criterio de aceptación consistió en:

- Coeficiente de variación: < 7.3 %
- Análisis de varianza ANOVA, las ecuaciones se pueden ver en el Anexo N°3.

Se basó en un planteamiento de hipótesis y de esta forma se concluyó si el método era preciso.

Análisis de varianza, asumiendo la prueba de hipótesis:

H<sub>0</sub>: Las varianzas son iguales  $SX_{21} = SX_{22}$

H<sub>a</sub>: Las varianzas son distintas  $SX_{21} \neq SX_{22}$

Se calcula el estadístico F así:

si  $SX_{21} > SX_{22}$   $F_{calc} = SX_{21} / SX_{22}$

Si  $F_{calc}$  es menor o igual a F de tabla se acepta H<sub>0</sub> y se rechaza H<sub>a</sub>, Si  $F_{calc}$  es mayor o igual a F de tabla se acepta H<sub>a</sub> y se rechaza H<sub>0</sub>.

▪ **Determinación de la exactitud:**

La exactitud del método se demostró analizando tres niveles de concentración de soluciones estándar de quercetina que se prepararon por triplicado para el nivel bajo y alto y sextuplicado para el nivel medio.

- Se prepararon soluciones estándares a tres niveles bajo (2.5 mg/L), medio (10 mg/L) y alto (80 mg/L).
- Para cada uno de los niveles se prepararon en un vial de 4 mL de capacidad 1 mL del patrón de quercetina correspondiente al nivel y 1 mL de AlCl<sub>3</sub> 2%, esto se dejó reposar durante 60 min.
- Se midieron las muestras en el espectrofotómetro UV-Mini 1240, SHIMADZU, a una longitud de onda de 420 nm.

La parte estadística para la exactitud del método consistió en calcular el porcentaje de recuperación aparente ( $R(\%)$ ), el sesgo ( $b$ ) y el error relativo porcentual ( $b(\%)$ ), además se calculó la media aritmética ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar ( $S$ ) el coeficiente de variación ( $CV$ ) y el intervalo de confianza ( $IC_{(\mu)}$ ) el formato de tabla para el cálculo de cantidad recuperada y fórmulas se encuentran en el Anexo 5.

Los criterios de aceptación que se tomaron en cuenta para este parámetro son:

- El promedio de la recuperación aparente debe encontrarse entre el rango de 80 % - 110 %

- El coeficiente de variación < 7.3 %
- El valor de la media debe incluirse en el intervalo.

#### 4.2.7 Determinación de flavonoides en muestras.

- Se añadió 1.0 mL de extracto (correspondiente a cada muestra), en un vial de 4 mL, seguido de 1.0 mL de la solución de AlCl<sub>3</sub> 2%.
- Se dejó reposar 60 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- Pasado el tiempo se leyó la absorbancia a 420 nm (se realizó por triplicado para cada muestra).
- Se determinó el contenido de flavonoides con la ecuación 3 (E3).
- Para determinar la concentración de las muestras se hizo a través de la sustitución en la ecuación obtenida por regresión lineal de los datos de la curva de concentraciones de quercetina (E1).

$$(E1) \quad y = mX + b$$

Despejando la ecuación (E1) en función de “x” y sustituyendo por términos se obtuvo:

$$(E2) \quad x = \frac{(y - b)}{m}$$

Dónde:

y = Absorbancia

x = Concentración

m = Pendiente

b = Ordenada de origen

Quedando la ecuación de la siguiente manera, con la que se calculó el contenido de Flavonoides:

$$(E3) \quad \text{Concentración (mg)} = \frac{(\text{Abs} - b)}{m} \times \text{FD}$$

Dónde:

Abs = Absorbancia de la muestra

m = Pendiente

b = Ordenada de origen

FD = Factor de dilución

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para saber si existe diferencia significativa entre las genéticas en cada muestra.

El análisis de varianza, asumiendo la prueba de hipótesis:

H<sub>0</sub>: Las genéticas son iguales  $SX_{21} = SX_{22}$

H<sub>a</sub>: Las genéticas son distintas  $SX_{21} \neq SX_{22}$

Se calculó el estadístico F así:

si  $SX_{21} > SX_{22}$   $F_{calc} = SX_{21}/SX_{22}$

Si  $F_{calc}$  es menor o igual a F tabla se acepta H<sub>0</sub> y se rechaza H<sub>a</sub>, Si  $F_{calc}$  es mayor o igual a F tabla se acepta H<sub>a</sub> y se rechaza H<sub>0</sub>.

Además de ANOVA, se aplicó la prueba de Tukey para determinar qué grupos difieren entre sí e identificar qué pares de medias de grupos son significativamente diferentes.

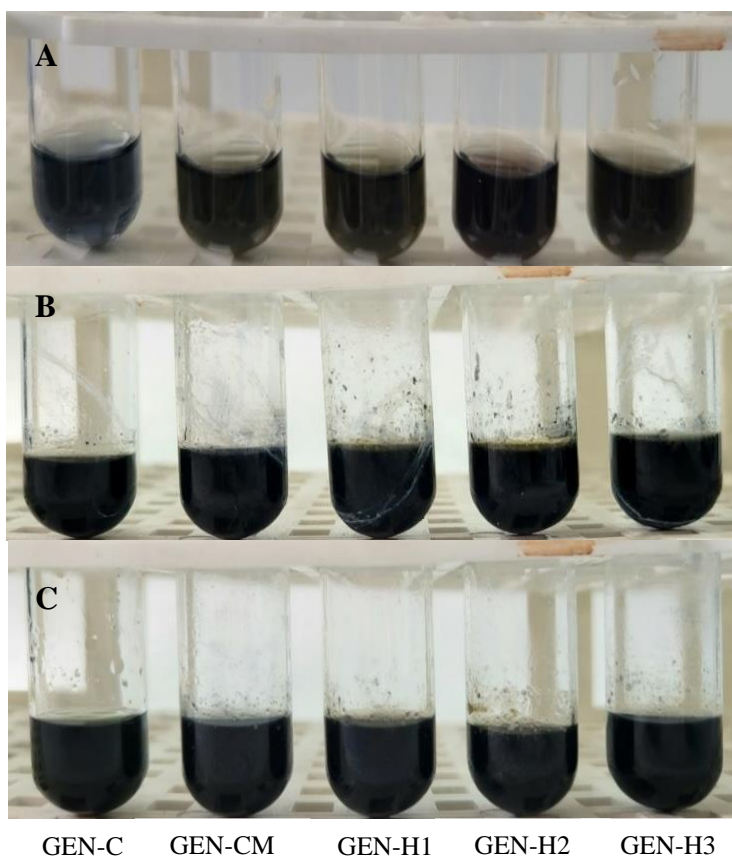
## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 5.1 Análisis Fitoquímicos

Se realizaron tres pruebas colorimétricas para poder identificar polifenoles totales, flavonoides y flavanoles en los extractos de las semillas crudas y derivados de cacao: licor y chocolate.

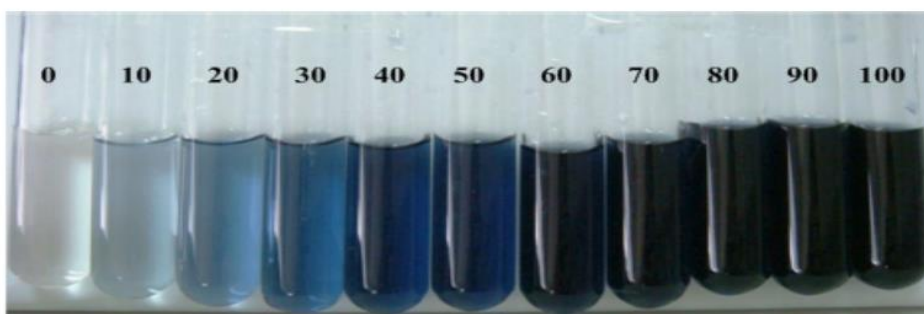
#### 5.1.1 Identificación de Polifenoles totales.

Para identificar la presencia de polifenoles totales se utilizó el ensayo de Folin-Ciocalteu, dando coloraciones que van desde un azul muy claro para concentraciones bajas intensificándose cuanto mayor sea la concentración. La figura 17, representa las coloraciones obtenidas para las muestras de semillas crudas (A), licor (B) y (C) chocolate; de las cinco genéticas diferentes.



**Figura 17.** Identificación de polifenoles totales.

La Figura 18, representa el color obtenido de la reacción entre los estándares de ácido gálico de 0-100  $\mu\text{g/mL}$  y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Tomado de (Theppakorn & Ploysri, 2014)



**Figura 18.** Escala de concentraciones de Polifenoles totales.

La Tabla 4, presenta los resultados cualitativos según la percepción de colores obtenidos en las muestras y tomando en cuenta la Figura 18, para identificar polifenoles totales.

**Tabla 4.** Identificación de polifenoles totales en semilla cruda.

<b>Genética</b>	<b>Semilla Cruda</b>	<b>Licor</b>	<b>Chocolate</b>
GEN-C	+++	++++	++++
GEN-CM	++++	++++	++++
GEN-H1	++++	++++	++++
GEN-H2	+++++	++++	++++
GEN-H3	++++	++++	++++

-Ausencia, + baja, ++ leve, +++ moderado, ++++ Alta, +++++ Muy alta

Los resultados obtenidos para la GEN-C indican que en semilla cruda la concentración es moderada, mientras que para licor y chocolate es alta, para GEN-CM tanto en semilla cruda como para sus derivados se indica una alta concentración, de manera análoga sucede para GEN-H1 y GEN-H3, por otra parte, GEN-H2 presenta un leve aumento en su coloración para semilla cruda indicando muy alta concentración, mientras sus derivados contienen alta concentración.

El análisis de Folin-Ciocalteu, permitió contrastar el contenido de polifenoles totales entre los genotipos. Se observó diferencia en muestras de semilla cruda, respecto a licor y chocolate; en éstos por sus altas concentraciones no fue perceptible la diferenciación entre cada genética debido a que en los procesos de transformación se forman compuestos de alto

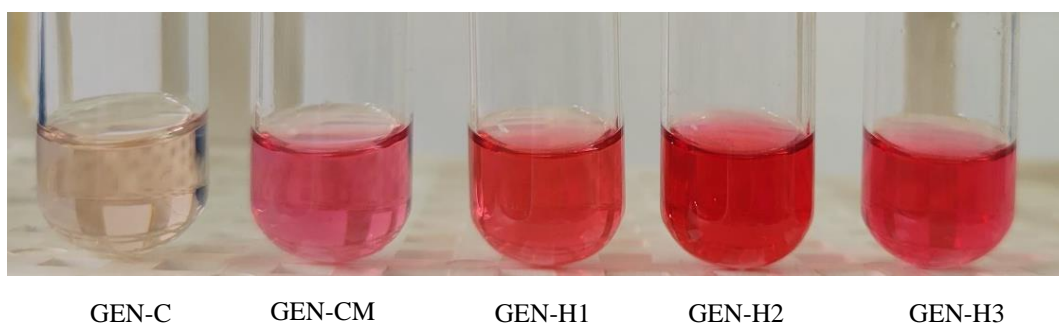
peso molecular (como taninos condensados o productos de reacción de Maillard), que también son contabilizados por el método de Folin-Ciocalteu.

### 5.1.2 Identificación de Flavonoides.

Para identificar la presencia de flavonoides se utilizó el ensayo de Shinoda, dando coloraciones diferentes tales como amarillo, rojo, magenta y violeta, visualizándose que a mayor intensidad del color mayor concentración de flavonoides.

#### 5.1.2.1 Semilla Cruda.

La Figura 19, presenta las coloraciones obtenidas para la identificación de flavonoides en semillas crudas de las 5 genéticas respectivas.



**Figura 19.** Identificación de flavonoides en Semillas crudas.

La Tabla 5, presenta la paleta de colores, así como sus códigos hexadecimal y RGB para la identificación de flavonoides en muestras de semilla cruda.

**Tabla 5.** Colores RGB y sus códigos para la identificación de flavonoides en semilla cruda.

Genética	Color	Nombre del color	Código hexadecimal #RRGGBB	Código decimal R, G, B
GEN-C		Arenas movedizas	#bda490	189,164,144
GEN-CM		Japónica	#da6c7b	218,108,123
GEN-H1		Techo de terracota	#b32720	179,39,32
GEN-H2		Tamarillo	#a90e12	169,14,18
GEN-H3		Amapola Alta	#bb252e	187,37,46

La información obtenida por medio del selector de color (Imagen Color Picker, s.f.), permitió establecer un mejor análisis respecto a los resultados, identificando así cual genética contiene

una mayor o menor concentración respecto al color observado, Asimismo se creó una paleta de colores con el fin de ser utilizados en análisis posteriores.

La Tabla 6, presenta los resultados de la identificación de flavonoides en las muestras de semillas crudas.

**Tabla 6.** *Identificación de flavonoides en semilla cruda.*

<b>Genética</b>	<b>Semilla Cruda</b>
GEN-C	-
GEN-CM	++
GEN-H1	+++
GEN-H2	++++
GEN-H3	+++

-Ausencia, + baja, ++ leve, +++ moderado, ++++ Alta, +++++ Muy alta

La muestra GEN-C, tiene poca coloración e indica ausencia o una concentración baja que no es identificable, GEN-CM tiene una coloración Japónica indicando una leve concentración, en cuanto a GEN-H1 tiene coloración terracota y GEN-H3 tiene un color rojo amapola por la poca diferencia entre ambas se clasificaron con una concentración moderada, mientras que GEN-H2 tiene una coloración tamarillo indicando alta concentración de flavonoides.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la prueba de Shinoda permite contrastar su contenido de flavonoides en las muestras de las 5 genéticas, y la paleta de colores comprueba los resultados siendo GEN-H2 la muestra de mayor concentración seguido de GEN-H1>GEN-H3>GEN-CM> GEN-C respectivamente.

### 5.1.2.2 Licor.

La Figura 20, presenta las coloraciones obtenidas para la identificación de flavonoides en muestras de licor de las 5 genéticas respectivas.



**Figura 20.** Identificación de flavonoides en Licor.

La Tabla 7, presenta la paleta de colores, así como sus códigos hexadecimal y RGB para la identificación de flavonoides en muestras de licor.

**Tabla 7.** Colores RGB y sus códigos para la identificación de flavonoides en licor.

Genética	Color	Nombre del color	Código hexadecimal #RRGGBB	Código decimal R, G, B
GEN-C		Caléndula	#c0822b	192,130,43
GEN-CM		Arena de Reno	#a85d16	168,93,22
GEN-H1		Falu Rojo	#871716	135,23,22
GEN-H2		Falu Rojo	#7e1b16	126,27,22
GEN-H3		Crail	#b34c3e	179,76,62

La información obtenida por medio del selector de color (Imagen Color Picker, s.f.), permitió establecer un mejor análisis respecto a los resultados, identificando así cual genética contiene una mayor o menor concentración respecto al color observado, Asimismo se creó una paleta de colores con el fin de ser utilizados en análisis posteriores

La Tabla 8, presenta los resultados de la identificación de flavonoides en las muestras de licor.

**Tabla 8.** Identificación de flavonoides en licor.

<b>Genética</b>	<b>Semilla Cruda</b>
GEN-C	+
GEN-CM	+
GEN-H1	++++
GEN-H2	++++
GEN-H3	+++

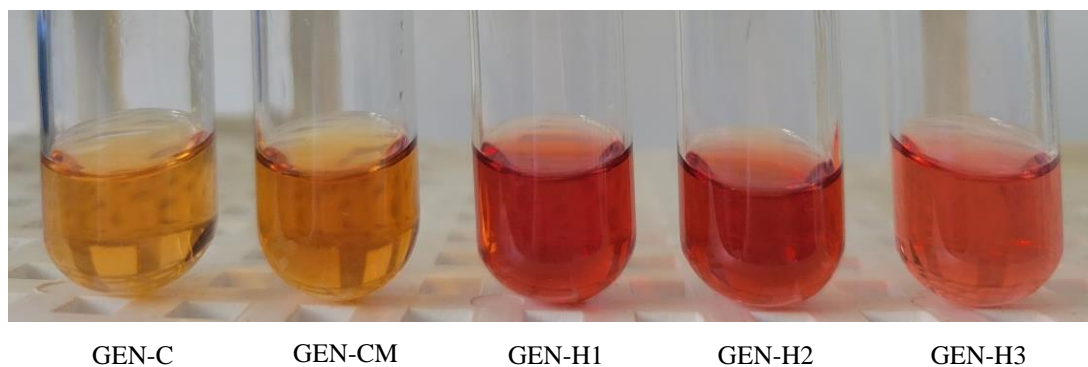
-Ausencia, + baja, ++ leve, +++ moderado, ++++ Alta, +++++ Muy alta

La muestra GEN-C y GEN-CM tienen coloración amarilla intermedia entre los colores caléndula y arena de reno indicando una baja concentración siendo GEN-C la más baja de ambas, por otra parte, GEN-H1 y GEN-H2 tienen coloración roja falu, ambas se identificaron con alta concentración siendo más intensa para GEN-H2, por otra parte, GEN-H3 tiene coloración crail lo que indica una concentración moderada de flavonoides.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la prueba de Shinoda permite contrastar su contenido de flavonoides en las muestras de licor de las 5 genéticas, y la paleta de colores comprueba los resultados, siendo GEN-H2 la muestra de mayor concentración seguido de GEN-H1 > GEN-H3 > GEN-CM > GEN-C respectivamente.

### 5.1.2.3 Chocolate.

La figura 21, presenta las coloraciones obtenidas para la identificación de flavonoides en muestras de chocolate de las 5 genéticas correspondiente.



**Figura 21.** Identificación de flavonoides en Chocolate.

La Tabla 9, presenta la paleta de colores, así como sus códigos hexadecimal y RGB para la identificación de flavonoides en muestras de licor.

**Tabla 9.** Colores RGB y sus códigos para la identificación de flavonoides en chocolate.

Genética	Color	Nombre del color	Código hexadecimal #RRGGBB	Código decimal R, G, B
GEN-C		Caléndula	#ba832c	186,131,44
GEN-CM		Caléndula	#b57a29	181,122,41
GEN-H1		Ladrillo viejo	#88221d	136,34,29
GEN-H2		Falu Rojo	#86261a	134,38,26
GEN-H3		Castaño	#b3514a	179,81,74

La información obtenida por medio del selector de color (Imagen Color Picker, s.f.), permitió establecer un mejor análisis respecto a los resultados, identificando así cual genética contiene una mayor o menor concentración respecto al color observado, Asimismo se creó una paleta de colores con el fin de ser utilizados en análisis posteriores

La Tabla 10, presenta los resultados de la identificación de flavonoides en las muestras de chocolate.

**Tabla 10.** Identificación de flavonoides en chocolate.

Genética	Semilla Cruda
GEN-C	+
GEN-CM	+
GEN-H1	++++
GEN-H2	++++
GEN-H3	+++

-Ausencia, + baja, ++ leve, +++ moderado, ++++ Alta, +++++ Muy alta

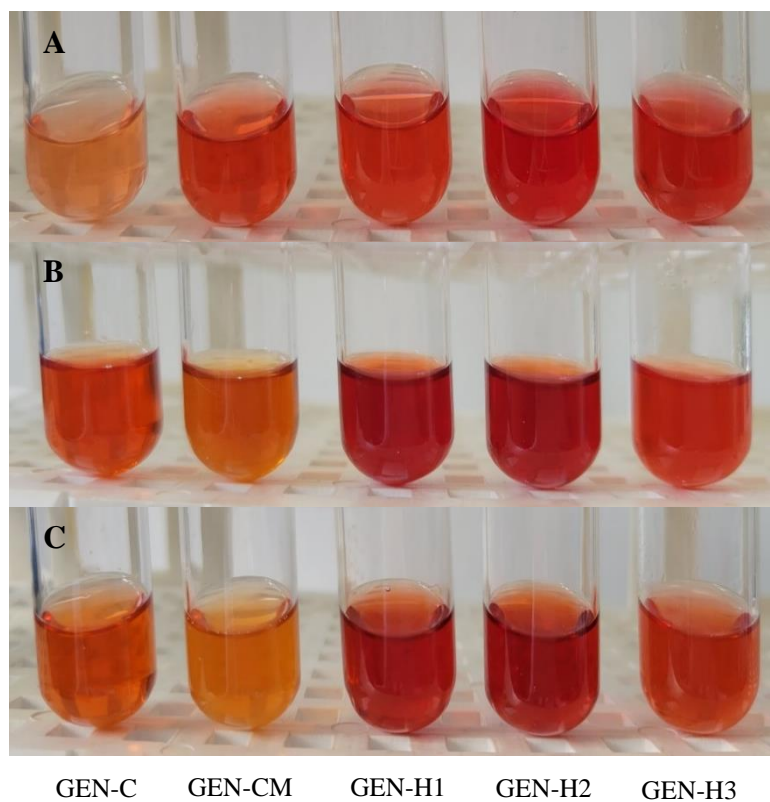
Las muestras GEN-C y GEN-CM se observaron con coloración caléndula indicando una baja concentración siendo GEN-C la más baja de ambas, por otra parte, GEN-H1 tiene coloración ladrillo viejo y GEN-H2 tienen coloración roja falu, ambas se identificaron con alta concentración siendo más intensa para GEN-H2, en cuanto a GEN-H3 tiene coloración castaña indicando una concentración moderada de flavonoides.

Con los resultados obtenidos se concluyó que la prueba de Shinoda permite contrastar su contenido de flavonoides en las muestras de chocolate de las 5 genéticas y la paleta de colores comprueba los resultados siendo GEN-H2 la muestra de mayor concentración seguido de GEN-H1>GEN-H3>GEN-CM>GEN-C respectivamente.

### 5.1.3 Identificación de Flavanoles.

Para identificar la presencia de flavanoles se utilizó el ensayo de Vainillina/HCl, dando coloraciones rojas de diferentes intensidades, cuanto mayor sea la concentración de flavanoles mayor será la coloración.

La Figura 22, muestra las coloraciones obtenidas para identificar flavanoles en muestras de 5 genéticas diferentes en semilla cruda (A), licor (B) y chocolate (C).



**Figura 22.** Identificación de Flavanoles.

La Tabla 11, presenta los resultados de la identificación de flavanoles en las muestras de semillas crudas, licor y chocolate.

**Tabla 11.** Identificación de flavanoles.

<b>Genética</b>	<b>Semilla Cruda</b>	<b>Licor</b>	<b>Chocolate</b>
GEN-C	-	+	+
GEN-CM	+	-	-
GEN-H1	+++	++++	++++
GEN-H2	++++	++++	++++
GEN-H3	+++	+++	+++

-Ausencias, + baja, ++ leve, +++ moderado, ++++ Alta, +++++ Muy alta

Los resultados obtenidos para la GEN-C en semilla cruda tiene poca coloración e indica ausencia o una concentración que no es identificable, mientras que para licor y chocolate es baja su concentración, para GEN-CM tiene baja concentración en semilla cruda, mientras que en licor y chocolate existe ausencia o una concentración que no es identificable debido a su coloración, para GEN-H1 en semilla cruda tiene una concentración moderada, en cuanto a licor y chocolate su concentración es alta. por otra parte, GEN-H2 presenta alta concentración tanto en semilla crudas como en sus derivados y finalmente GEN-H3 su concentración es moderada tanto para semillas crudas como para sus derivados.

En definitiva, el ensayo de Vainillina/HCl, sí permitió contrastar el contenido de flavanoles, debido a la variación de las intensidades en todas las muestras lo que indica una diferencia en las concentraciones de cada genética tanto para semilla cruda como para sus derivados.

### **5.2 Determinación de flavonoides por el método de AlCl<sub>3</sub>.**

Para poder determinar los flavonoides en las muestras fue necesario primero realizar la validación del método de AlCl<sub>3</sub> para poder asegurar que los datos obtenidos son confiables según la aceptación de los criterios.

## 5.2.1 Validación del método analítico.

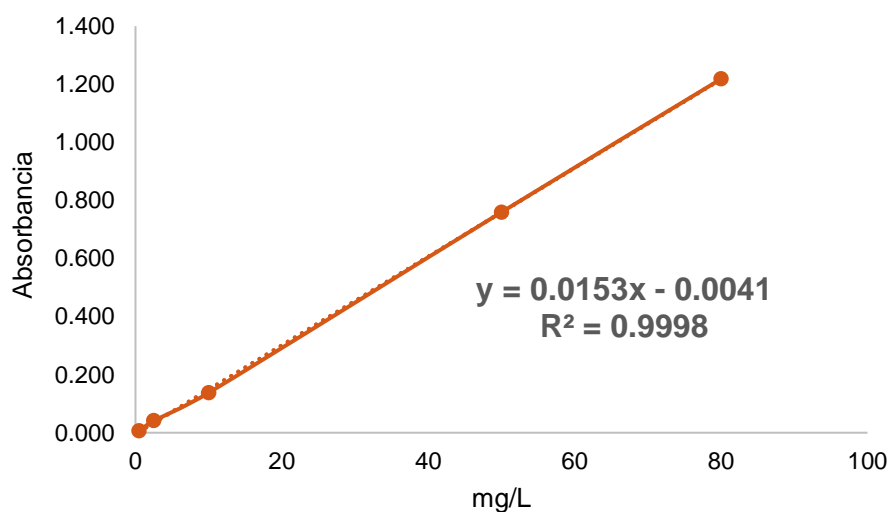
### 5.2.1.1 Linealidad del método

La linealidad del método se demostró preparando a partir de la solución madre 5 concentraciones distintas, las concentraciones fueron las siguientes 0.5 mg/L, 2.5 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L y 80 mg/L, se realizaron lecturas de cada solución a la longitud de 420 nm, se analizó por triplicado.

**Tabla 12.** Datos para curva de calibración.

N°	Concentración (mg/L)	Promedio Abs
1	0.5	0.006
2	2.5	0.041
3	10	0.138
4	50	0.759
5	80	1.218

La curva de calibración representada en la Figura 24, se obtuvo al graficar los resultados de absorbancias de la Tabla 11. Este ejercicio permitió evidenciar que el método analítico cuenta con la capacidad de obtener resultados en una dirección proporcional, es decir la concentración o cantidad del analito en un rango definido mantiene un comportamiento lineal.



**Figura 23.** Curva de calibración Absorbancia vs Concentración

Para verificar los datos se procedió a calcular estadísticamente el método de estimación por mínimos cuadrados, proporcionando los datos necesarios, los resultados que se presentan en la Tabla 24, Anexo 1.

**Tabla 13.** Estadístico para la linealidad.

<b>Prueba estadística</b>	<b>Resultado</b>		
<b>Pendiente (<math>b_1</math>)</b>	0.0153		
<b>Ordenada al origen (<math>b_0</math>)</b>	-0.0040		
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9998		
<b>Intervalo de confianza de la pendiente (<math>IC_{(Q1)}</math>)</b>	0.0153	±	0.0007
	<b>Superior</b>		0.0160
	<b>Inferior</b>		0.0146
<b>Intervalo de confianza para la ordenada al origen (<math>IC_{(Q0)}</math>)</b>	-0.0041	±	0.0148
	<b>Superior</b>		0.0108
	<b>Inferior</b>		-0.0189

El coeficiente de correlación es de  $r = 0.9999$ , el criterio por el que se requirió este cálculo específica que debe ser mayor a 0.98 indicando una linealidad adecuada del método y una buena predicción acerca de los resultados.

Por otra parte, el intervalo de confianza para la ordenada al origen de estándares a diferentes concentraciones incluye el cero y está en coordenadas de negativo a positivo determinando un intervalo aceptable por su análisis estadístico.

Además, como se observa en la Figura 24, los residuales de la linealidad del método, presenta una distribución aleatoria y no refleja tendencias, demostrándose la ausencia de error sistemático por lo que el método cumple con el supuesto del modelo lineal.



**Figura 24.** Gráfico de residuales

### 5.2.1.2 Límite de detección y cuantificación.

En la determinación de límites se realizó la lectura a 10 blancos cuyos resultados se muestran en la Tabla 26, Anexo 2, los cuales fueron utilizados para el desarrollo experimental y obtener mediante la ejecución estadística la desviación estándar encontrando que la menor cantidad donde la señal es distinguida de la del ruido es 0.153 mg/L y la concentración límite de cuantificación bajo las condiciones de trabajo del laboratorio fue 0.462 mg/L como se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Resultados del límite de detección y cuantificación

<b>Desviación estándar (<i>S</i>)</b>	0.00071
<b>Límite de detección (<i>LD</i>)</b>	0.153 mg/L
<b>Límite de cuantificación (<i>LC</i>)</b>	0.462 mg/L

### 5.2.1.3 Precisión.

La estimación de la repetibilidad del método se realizó con el cálculo del porcentaje de recobro para medir la proporción de concordancia en respuesta al método, variación que se observa cuando el analista mide la misma parte muchas veces logrando la repetibilidad siempre que se conserven las mismas condiciones, en este caso se tomaron tres niveles de concentración de 2.5, 10 y 80 mg/L, las ecuaciones y datos obtenidos se encuentran en Tabla 27, Anexo 3.

**Tabla 15.** Resultados estadísticos del parámetro de repetibilidad.

<b>Nivel de concentración</b>	<b>CV %</b>	<b>R (%)</b>
Bajo	3.6	100.48
Medio	0.8	107.25
Alto	2.1	98.88

El coeficiente de variación al ser menor que el criterio de aceptación de 7.3 % nos indica que la dispersión es baja por lo que, el método es preciso, lo cual podemos confirmar también con el porcentaje de recobro que está dentro de los rangos de aceptación 80%-110%.

Para la precisión intermedia se obtuvo el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación porcentual, en este caso se tomaron tres niveles de concentración de 2.5,10 y 80 mg/L y se midieron 10 veces cada nivel, en condiciones operativas igual, pero con diferente analista. Las ecuaciones y datos obtenidos se encuentran en Tablas 30 y 31, Anexo 3.

**Tabla 16.** Resultados estadísticos del parámetro precisión intermedia

<b>Nivel de concentración</b>	<b>Analista 1</b>		<b>Analista 2</b>	
	<b>CV%</b>	<b>R (%)</b>	<b>CV%</b>	<b>R (%)</b>
<b>Bajo</b>	3.6	100.48	3.6	100.92
<b>Medio</b>	0.8	107.25	0.7	105.73
<b>Alto</b>	2.1	98.88	1.0	99.29

El coeficiente de variación porcentual al ser menor que el criterio de aceptación de 7.3 % nos indica que la dispersión es baja por lo que, el método es preciso, tanto para el analista 1 como el analista 2, de igual manera el porcentaje de recobro está dentro de los rangos de aceptación 80%-110%.

Para la precisión intermedia fue necesario estimar un análisis de varianza para comprobar si existía diferencia significativa con respecto a las variables y las condiciones de análisis de este parámetro.

Con los datos obtenidos se realizó el análisis de Varianza (ANOVA), presentando en la

Tabla 17 un resumen de los resultados obtenidos, para estudiar si no existe una diferencia significativa entre los dos grupos de mediciones a diferentes condiciones que en este caso la condición que varió fue el analista, el desarrollo de los cálculos se encuentra en el Anexo 3.

**Tabla 17.** Análisis de varianza de la precisión intermedia.

	<b>Grado de libertad</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Fcal</b>	<b>Ftabl</b>
Entre grupos	1	0.034	0.034	<b>2.73x10<sup>-5</sup></b>	<b>4.130</b>
Dentro de los grupos	34	42676.76	1255.199		
Total	35	42676.79			

Los resultados para la precisión intermedia a partir de las concentraciones obtenidas de dos analistas diferentes, se evaluaron por medio del estadístico de distribución F de Fisher-Snedecor donde resultó que F calculado =  $2.73 \times 10^{-5}$ , es conforme al criterio de aceptación donde  $F_{cal} < F_{tabl}$  ( $2.73 \times 10^{-5} < 4.130$ ), por lo tanto, en el planteamiento de la hipótesis nula en el que las varianzas son iguales se acepta y se considera que el método es preciso bajo las condiciones a las que fue adaptado.

#### **5.2.1.4 Exactitud**

La exactitud fue evaluada utilizando soluciones de estándar de quercetina mediante 3 niveles de concentraciones de: 2.5 mg/L, 10 mg/L y 80 mg/L, obteniendo los resultados de la Tabla 32, Anexo 4. Al obtener los datos, se calculó estadísticamente los requerimientos necesarios para su análisis y darles cumplimiento a los criterios, en la Tabla 18 se muestran los resultados.

**Tabla 18.** Resultados estadísticos para el parámetro de exactitud.

Prueba estadística	Nivel Bajo		Nivel Medio	Nivel Alto
<b>Coefficiente de variación (CV %)</b>	6.5		1.0	3.2
<b>Intervalo de confianza (IC<sub>(μ)</sub>)</b>	2.5120 ± 0.0775		9.6580 ± 0.0464	78.7429 ± 1.192
	<b>Superior</b>	2.4344	9.6116	77.5507
	<b>Inferior</b>	2.5895	9.7043	79.9352

En este resultado se conoce que para un análisis de intervalo de trabajo debe verse incluido un valor que figure entre el límite superior e inferior de los resultados; para la exactitud, el intervalo incluye la media aritmética para los tres niveles de concentración.

**Tabla 19.** Recuperación aparente y estadísticos para los tres niveles de concentración.

Nivel	Abs. Prom.	Contr. Prom.	Sesgo	Err. Rel. %	R (%) Aparente
<b>Bajo</b>	0.034	2.512	0.01	0.48	100.48
<b>Medio</b>	0.143	9.658	-0.34	-3.64	96.58
<b>Alto</b>	1.201	78.743	-1.26	-1.57	98.43

Para determinar la concentración o el grado de cercanía de los datos, se calculó la recuperación aparente  $R$  (%) los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 32 y las ecuaciones utilizadas para su resolución se encuentran en el Anexo 4.

Al analizar la cercanía de los resultados al valor verdadero, se estimó además un componente común de error sistemático o sesgo dando como resultado 0.01, -0.34 y -1.26 y el error porcentual 0.48%, -3.64 y -1.57, respectivamente. Las cantidades de sesgos negativos solo implica la existencia de valores bajos de la variable obtenidas experimentalmente, eso reafirma los datos obtenidos en el análisis debido que al evaluar el porcentaje de recuperación se obtuvo 100.48%, 96.58% y 98.43%, son valores que se encuentran entre el rango de los porcentajes de recobro del criterio de aceptación (80%-110%) verificando de esta manera que el método es exacto para cada nivel.

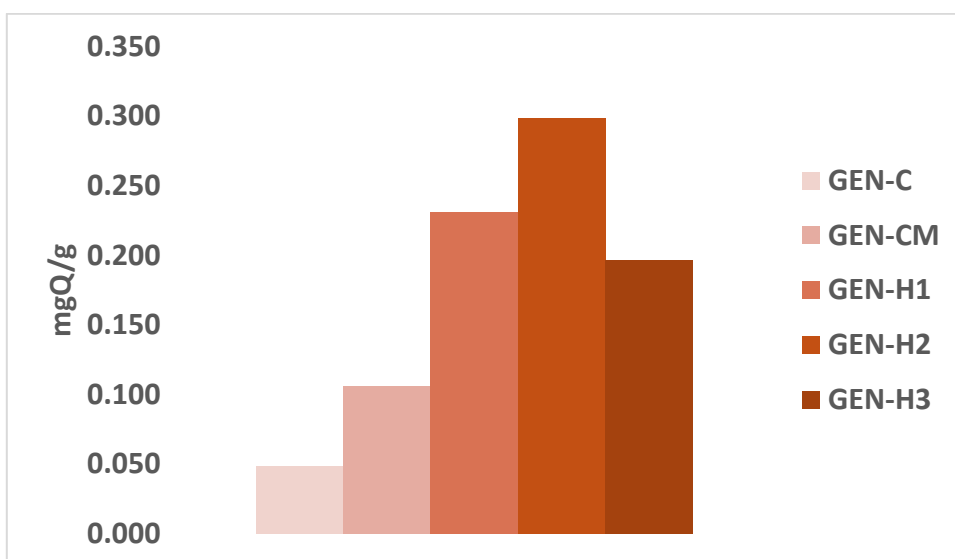
La validación comprueba que el método de  $AlCl_3$  es confiable para determinar flavonoides en los niveles estudiados.

### 5.2.2 Determinación de flavonoides en muestras

Para determinar la concentración de las muestras se hizo a través de la sustitución en la ecuación obtenida por regresión lineal de los datos de la curva de concentraciones de quercetina (Figura 23) y a partir de la ecuación (E3).

#### 5.2.2.1 Semilla cruda.

La Figura 25, presenta en forma gráfica los resultados de las 5 genéticas en muestras de semillas crudas.



**Figura 25.** Concentración de flavonoides en muestras de semilla cruda.

Con los datos obtenidos en la Tabla 35, Anexo 5, se realizó el análisis de Varianza (ANOVA), para determinar si existía diferencia significativa entre las 5 genéticas y posteriormente la prueba de Tukey para determinar que grupos tienen diferencias significativas entre sus medias.

**Tabla 20.** Concentración de flavonoides en muestras de semilla cruda.

Muestra	Mg Q/g
GEN-C	$0.047 \pm 0.0015^a$
GEN-CM	$0.108 \pm 0.0035^b$
GEM-H1	$0.226 \pm 0.0147^c$
GEN-H2	$0.301 \pm 0.0025^d$

GEN-H3	0.206 ± 0.0158 <sup>e</sup>
--------	-----------------------------

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

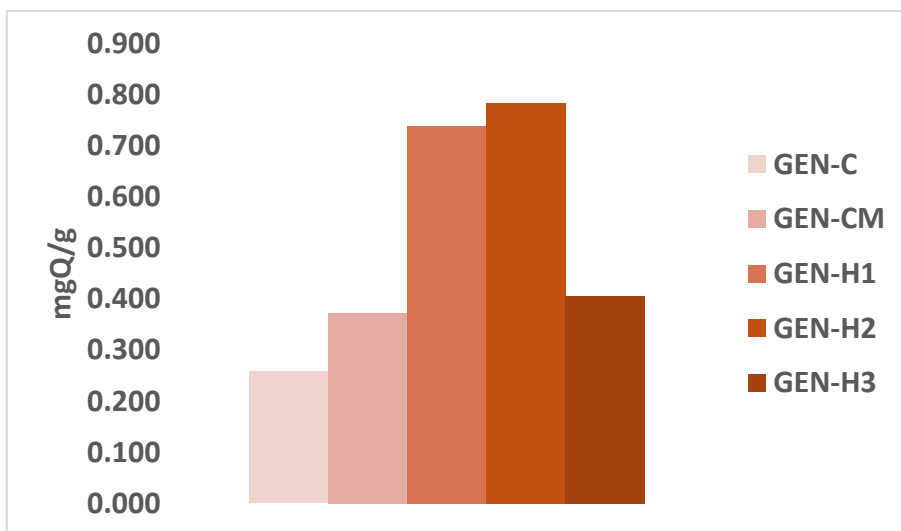
Los resultados obtenidos para semillas de cacao crudas, muestran variaciones en las 5 genéticas siendo GEN-C ( $0.047 \pm 0.0015$  mg Q/g) la de menor concentración de flavonoides influenciado por la baja cantidad de antocianinas mientras que GEN-H2 ( $0.301 \pm 0.0025$  mg Q/g) es la genética de mayor concentración, por su alto contenido de antocianina característico de su genética.

A partir de los datos de ANOVA se obtuvo un  $F_{calc}$  de 710.9 y un  $F_{tabl}$  de 3.48, siendo  $F_{calc} > F_{tabl}$  por tanto se acepta la hipótesis alternativa ( $H_a$ ) y se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ), confirmando que las concentraciones de las 5 genéticas son significativamente diferentes.

También se realizó la prueba de Tukey y se obtuvo que todas las medias tienen diferencia significativa y ninguna guarda similitud en la concentración de flavonoides, siendo GEN-H2 de mayor concentración seguido de GEN-H1 > GEN-H3 > GEN-CM > GEN-C como lo muestra la Tabla 36, Anexo 5.

### 5.2.2.2 Licor.

La Figura 26, presenta en forma gráfica los resultados de las 5 genéticas en muestras de licor.



**Figura 26.** Concentración de flavonoides en muestras de licor

Con los datos obtenidos en la Tabla 37, Anexo 6, se realizó el análisis de Varianza (ANOVA), para determinar si existía diferencia significativa entre las 5 genéticas y posteriormente la

prueba de Tukey para determinar que grupos tienen diferencias significativas entre sus medias.

**Tabla 21.** Concentración de flavonoides en muestras de licor

Muestra	Mg Q/g
GEN-C	0.258 ± 0.0017 <sup>a</sup>
GEN-CM	0.373 ± 0.0040 <sup>b</sup>
GEM-H1	0.739 ± 0.0096 <sup>c</sup>
GEN-H2	0.784 ± 0.0075 <sup>d</sup>
GEN-H3	0.407 ± 0.0035 <sup>e</sup>

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Los resultados obtenidos para licor, muestran variaciones en las 5 genéticas siendo GEN-C (0.258 ± 0.0017 mg Q/g) la de menor concentración de flavonoides mientras que GEN-H2 (0.784 ± 0.0075 mg Q/g) es la genética de mayor concentración. Las concentraciones en las 5 genéticas presentaron un aumento en comparación a las concentraciones en semillas crudas, debido a la polimerización y formación de compuestos de alto peso molecular no hidrolizables. (Martínez, 2010)

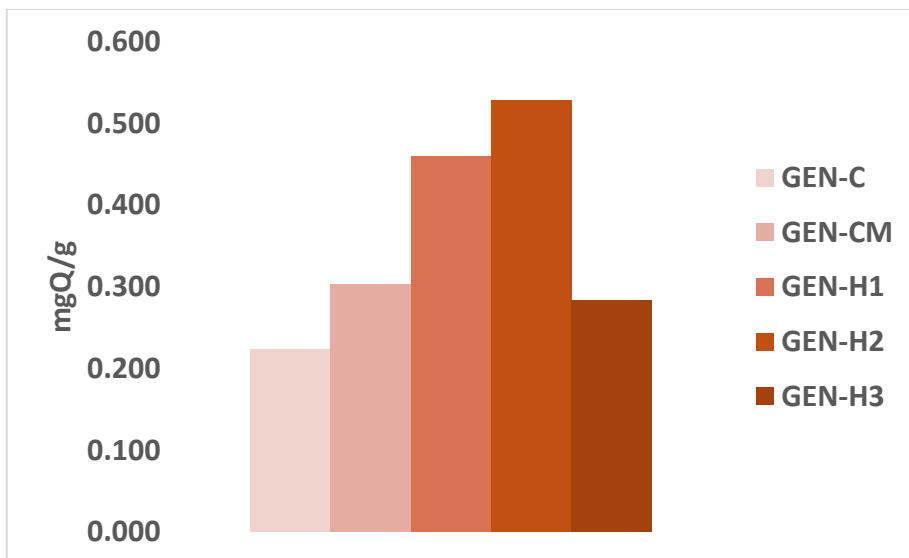
Durante la etapa de transformación del licor de cacao se presenta una pérdida significativa de (-)-epicatequina y de procianidinas B2 y C1 que son los compuestos más abundantes, sin embargo, que el contenido de (±)-Catequina aumenta. Lo anterior es asociado a la epimerización de la (-)-Epicatequina hacia (±)- Catequina. (Wang & Helliwell, 2000)

A partir de los datos de ANOVA se obtuvo un  $F_{calc}$  de 10,356.6 y un  $F_{tabl}$  de 3.48, siendo  $F_{calc} > F_{tabl}$  por tanto se acepta la hipótesis alternativa ( $H_a$ ) y se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ), confirmando que las concentraciones de las 5 genéticas son significativamente diferentes.

Además, se realizó la prueba de Tukey y se obtuvo que todas las medias tienen diferencia significativa y ninguna guarda similitud en la concentración de flavonoides, siendo GEN-H2 de mayor concentración seguido de GEN-H1 > GEN-H3 > GEN-CM > GEN-C como lo muestra la Tabla 39, Anexo 6.

### 5.2.2.3 Chocolate.

La Figura 27, presenta en forma gráfica los resultados de las 5 genéticas en muestras de chocolate.



**Figura 27.** Concentración de flavonoides en muestras de chocolate

Con los datos obtenidos en la Tabla 40, Anexo 7, se realizó el análisis de Varianza (ANOVA), para determinar si existía diferencia significativa entre las 5 genéticas y posteriormente la prueba de Tukey para determinar que grupos tienen diferencias significativas entre sus medias.

**Tabla 22.** Concentración de flavonoides en muestras de chocolate.

Muestra	mg Q/g
GEN-C	$0.223 \pm 0.0040^a$
GEN-CM	$0.303 \pm 0.0036^b$
GEN-H1	$0.460 \pm 0.0161^c$
GEN-H2	$0.528 \pm 0.0139^d$
GEN-H3	$0.283 \pm 0.0010^e$

\*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Los resultados obtenidos para licor, muestran variaciones en las 5 genéticas siendo GEN-C ( $0.223 \pm 0.0040$  mg Q/g) la de menor concentración de flavonoides mientras que GEN-H2 ( $0.528 \pm 0.0139$  mg Q/g) es la genética de mayor concentración. Las concentraciones en las 5 genéticas presentaron un aumento en comparación a las concentraciones en semillas crudas pero una disminución con respecto a las muestras de licor, dichas concentraciones de

flavonoides se deben a factores como la temperatura y tiempo del refinado o conchado, mientras mayor y más prolongado es, mayor degradación de los polifenoles (Acevedo et al 2017).

A partir de los datos de ANOVA se obtuvo un  $F_{calc}$  de 1,205.2 y un  $F_{tabl}$  de 3.48, siendo  $F_{calc} > F_{tabl}$  por tanto se acepta la hipótesis alternativa ( $H_a$ ) y se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ), confirmando que las concentraciones de las 5 genéticas son significativamente diferentes.

También se realizó la prueba de Tukey y se obtuvo que todas las medias tienen diferencia significativa y ninguna guarda similitud en la concentración de flavonoides, siendo GEN-H2 de mayor concentración seguido de GEN-H1 > GEN-H3 > GEN-CM > GEN-C como lo muestra la Tabla 42, Anexo 7.

## 6 CONCLUSIONES

1. Los métodos colorimétricos constituyen una estrategia analítica efectiva para la identificación de accesiones funcionales de *Theobroma cacao L*, al facilitar la identificación de metabolitos secundarios como polifenoles y flavonoides, relevantes en la evaluación nutracéutica y el mejoramiento genético del cultivo.
2. El método colorimétrico de Folin-Ciocalteu permitió diferenciar el contenido de polifenoles totales en las muestras de los 5 genotipos, con mayor claridad en muestras de semilla cruda. En contraste, en subproductos como el licor y el chocolate, dichas diferencias fueron menos evidentes, por la formación de compuestos fenólicos de alto peso molecular durante el procesamiento. Estos compuestos, son detectables por el reactivo Folin-Ciocalteu y limitan el contraste entre genotipos.
3. Por medio del ensayo de Shinoda se identificó flavonoides en todas las muestras y contrastó cualitativamente el contenido de las muestras de los 5 genotipos, siendo GEN- H2 > GEN-H1 > GEN-H3 > GEN-CM > GEN-C, para la muestra de semilla cruda y sus derivados, ya que siguieron el mismo patrón, cabe resaltar que las muestras de licor fueron las de mayor concentración de flavonoides.
4. Por medio del ensayo de Vainillina/HCl se identificó flavanoles y contrastó cualitativamente el contenido de las muestras de los 5 genotipos, siendo GEN-H1 y GEN-H2 las de mayor contenido tanto en semilla cruda como en sus derivados.
5. La validación comprueba que el método de AlCl<sub>3</sub> por la técnica espectrofotométrica Uv-Vis, es confiable para determinar flavonoides en *Theobroma Cacao L*, en los niveles estudiados.
6. La determinación de flavonoides por el método de AlCl<sub>3</sub> demostró que de las muestras de los 5 genotipos, la muestra GEN-H2 es la de mayor contenido de flavonoides teniendo  $0.784\pm 0.0075$  mgQ/g en muestra de licor, seguido de  $0.528\pm 0.0139$  mgQ/g en chocolate y  $0.301\pm 0.0025$  mgQ/g en semilla cruda.

7. La comparación de las concentraciones de flavonoides en semilla cruda, y sus derivados, se verificó por medio del análisis de varianza y prueba de Tukey con un nivel de significancia de 95% demostrando que existe diferencia significativa entre cada variedad genética, siendo GEN-H2 de mayor concentración seguido de GEN-H1 > GEN-H3 > GEN-CM > GEN-C.

## 7 RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios para comparar si existe diferencia entre las metodologías utilizadas para extraer flavonoides con el fin de obtener la mayor cantidad de estos en los extractos.
2. Utilizar el presente estudio como guía base para la determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometría UV-Vis, en muestras de semilla cruda y sus derivados (licor y chocolate) de los mismos cinco genotipos.
3. Se recomienda realizar un análisis complementario mediante una técnica instrumental de mayor sensibilidad y especificidad, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con el fin de identificar y cuantificar flavonoides individuales, particularmente catequina y epicatequina, en todas las muestras evaluadas (semilla cruda, licor y chocolate).
4. Se puede emplear el método de  $AlCl_3$  para la caracterización de diferentes accesiones de *Theobroma Cacao L*, así como en el control de calidad para el desarrollo de nuevos productos con alto contenido de flavonoides.
5. Fomentar la realización de pasantías de investigación en la Escuela de Química a fin de que el futuro profesional se involucre en áreas multidisciplinarias donde la química es fundamental para el desarrollo de la investigación traslacional.

## 8 REFERENCIAS

- Acevedo, K., Díaz, D., Acosta, E., Valencia, W., & Penagos, L. (2017). Efecto-de-la-temperatura-del-conchado sobre los polifenoles en un chocolate semi amargo. *Alimentos Hoy*, 25. <https://chocolates.com.co/wp-content/uploads/2023/08/2017.-Efecto-de-la-temperatura-del-conchado-sobre-los-polifenoles-en-un-chocolate-semi-amargo.pdf>
- Andres, J., Quintero, G., De, F., Farmaceutica, Q., En, P., & Farmaceuticas, C. (2012). *Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de preindustrialización*.
- Bayard, V., Chamorro, F., Motta, J., & Hollenberg, N. K. (2007). Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. *International journal of medical sciences*, 4(1), 53–58. <https://doi.org/10.7150/IJMS.4.53>
- Cacao de Excelencia. (2024). *Guía para la Evaluación de la Calidad y el Sabor del Cacao. Compilado por el programa Cacao de Excelencia de la Alianza de Bioversity International y CIAT, en colaboración con los miembros del Grupo de Trabajo de International Standards for the Assessment of Cacao Quality and Flavour - ISCQF*. Bioversity International.
- Cáceres, A., Giraldo, L., & Muvdi, C. (2022). Extracción de polifenoles: una comparación a partir de cáscara de cacao húmeda vs cáscara de cacao secada. *Ingeniería y Competitividad*, 25(2), 25. <https://doi.org/10.25100/iyc.25i2>
- Castellanos, N. (2016). *Aislamiento de hesperidina a partir de extractos etanólicos obtenidos de cáscara de mandarina y evaluación de su actividad antioxidante*. <https://repository.usta.edu.co/server/api/core/bitstreams/0232fc54-585e-468d-a3ef-49f1d27f4860/content>
- Castro, M., Hernández, J., Marcilla, S., Córdova, J., Solari, F., & Chire, G. (2017). Efecto del contenido de grasa en la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de theobroma cacao L. “cacao”. *Ciencia e Investigación*, 19(1), 19–23. <https://doi.org/10.15381/ci.v19i1.13623>
- Díaz, A., Ruiz, A., Reyes, E., Galván, A., Novo, J., Peinado, J., Valdés, F., & Fiñana, I. (s/f). 8. *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.

Recuperado el 28 de febrero de 2025, de [https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_espectrofotometria.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_espectrofotometria.pdf)

Fajardo, A., Ramirez, J., & Rivera, A. (2016). Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (*Allium cepa*). *UGCiencia*, 22(1), 119. <https://doi.org/10.18634/ugcj.22v.1i.599>

Gamarra, J. R., Cano, A., Torre, M. I. La, & Weigend, M. (2017). *Hoja botánica: Cacao-Theobroma cacao L.* <https://www.researchgate.net/publication/321796762>

Gil, M., Uribe, D., Gallego, V., Bedoya, C., & Arango, S. (2021). Traceability of polyphenols in cocoa during the postharvest and industrialization processes and their biological antioxidant potential. En *Heliyon* (Vol. 7, Número 8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07738>

Hagerman, A. E. (2018). *The Tannin Handbook*. <http://www.users.muohio.edu/hagermae>

Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan. En *Food Sci. Technol. Res* (Vol. 10, Número 1). <https://doi.org/10.3136/fstr.10.86>

Imagen Color Picker. (s.f.). *Imagen Color Picker*. Recuperado de <http://www.imagencolorpicker.com>

Makuasa, D. A., & Nigsh, P. (2020). The Analysis of Total Flavonoid Levels In Young Leaves and Old Soursop Leaves (*Annona muricata L.*) Using UV-Vis Sepctrofotometry Methods. *Journal of Applied Science, Engineering, Technology, and Education*, 2(1), 11–17. <https://doi.org/10.35877/454ri.asci2133>

Martínez, S. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. *Universidad Cpmplutense de Madrid*. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/47452>

Martín, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Serrano, A. B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., & Goya, L. (2008). Protection of Human HepG2 Cells against Oxidative Stress by Cocoa Phenolic Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7765–7772. <https://doi.org/10.1021/JF801744R>

- Micheli, F., Gultinan, M., Gramacho, K. P., Wilkinson, M. J., Figueira, A. V. de O., Cascardo, J. C. de M., Maximova, S., & Lanaud, C. (2010). Functional Genomics of Cacao. *Advances in Botanical Research*, 55(C), 119–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380868-4.00003-X>
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., & Nebesny, E. (2015). The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(9), 1176–1192. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.686934>
- Organismo Salvadoreño de Acreditación. (2017). *Sistema de gestión de calidad. G 9.6 Validación de métodos analíticos fisicoquímicos*.
- Osorio, E., Catalina, D., Ramírez, A., Carlos, L., Hormaza, C., Muñoz, S., Elkin, A., & Jaramillo, G. (2022). *El Cacao y la Salud Humana*.
- Otálvaro, E. V. (2021). *Obtención de Un Extracto de Cacao y Café con alto contenido de Compuestos Bioactivos*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=304768>
- Suazo, Y., Pardo, G., & Arozarena, I. (2014). Effect of Fermentation and Roasting on the Phenolic Concentration and Antioxidant Activity of Cocoa from Nicaragua. *Journal of Food Quality*, 37(1), 50–56. <https://doi.org/10.1111/JFQ.12070>
- Sucasaca, A., Guevara, G., & Eusebio, D. (2021). Efectos del colorante natural inflorescencia de colli (*Buddleja Coriacea*) en la solidez de color de teñido de fibras de alpaca. *Revista de innovación y transferencia productiva*, 1(2). <https://doi.org/10.54353/RITP.V1I2.E003>
- Theppakorn, T., & Ploysri, K. (2014). Development of a visual test kit for estimation of total polyphenols in tea. En *International Food Research Journal* (Vol. 21, Número 2).
- Torres, M. (2012). *Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro*. [Universidad Politécnica Superior]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=102863>

Vermeris, W., & Nicholson, R. (2008). *Phenolic Compound Biochemistry*.  
<https://drive.google.com/file/d/1eQBfzwnlEKjgyrBxEsaAImZk4z5b2wvD/view>

Villamil, J., Cala, T., & Herrera, J. (2009). *El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento*. [http://scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-08072009000200003](http://scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072009000200003)

## ANEXO N° 1

### FÓRMULAS PARA EL PARÁMETRO DE LINEALIDAD Y TABLAS DE RESULTADOS.

Pendiente  $b_1$  
$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen  $b_0$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación  $r^2$

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza de la pendiente  $IC_{(\beta_1)}$

$$S_{b_1} = S_{\frac{y}{x}} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$IC_{(\beta_1)} = b_1 \pm t_{\alpha/2, n-2} * S_{b_1}$$

Intervalo de confianza para la ordenada en el Origen  $IC_{(\beta_0)}$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$S_{b_0} = S_{\frac{y}{x}} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$IC_{(\beta_0)} = b_0 \pm t_{\alpha/2, n-2} * S_{b_0}$$

**Tabla 23.** Curva de calibración por triplicado

N°.	Concentración (mg/L)	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Promedio
1	0.5	0.006	0.007	0.005	0.006
2	2.5	0.045	0.041	0.038	0.041
3	10	0.139	0.132	0.142	0.138
4	50	0.763	0.754	0.761	0.759
5	80	1.202	1.242	1.21	1.218

**Tabla 24.** Estimación de mínimos cuadrados para la linealidad

N°	Muestras de ensayo (x)	Concentración medida (y)	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	xy
1	0.5	0.006	0.25	0.00004	0.003
2	0.5	0.007	0.25	0.00005	0.0035
3	0.5	0.005	0.25	0.00003	0.0025
4	2.5	0.045	6.25	0.00203	0.1125
5	2.5	0.041	6.25	0.00168	0.1025
6	2.5	0.038	6.25	0.00144	0.095
7	10	0.139	100	0.01932	1.39
8	10	0.132	100	0.01742	1.32
9	10	0.142	100	0.02016	1.42
10	50	0.763	2500	0.58217	38.15
11	50	0.754	2500	0.56852	37.7
12	50	0.761	2500	0.57912	38.05
13	80	1.202	6400	1.44480	96.16
14	80	1.242	6400	1.54256	99.36
15	80	1.212	6400	1.46894	96.96
<b>Sumatoria</b>	<b>429</b>	<b>6.489</b>	<b>27019.5</b>	<b>6.24829</b>	<b>410.829</b>

## ANEXO N° 2

### FÓRMULAS PARA EL PARÁMETRO DE LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN Y TABLA DE RESULTADOS.

Desviación estándar 
$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Límite de detección 
$$LOD = \frac{3.3 * Sb}{m}$$

Límite de cuantificación 
$$LOQ = \frac{10 * Sb}{m}$$

Dónde:

Sb = Desviación estándar

m = Pendiente

**Tabla 25.** Resultados de blancos

N°	a 420 nm
1	0.078
2	0.079
3	0.079
4	0.078
5	0.078
6	0.08
7	0.078
8	0.078
9	0.079
10	0.078
<b>y</b>	<b>0.0785</b>
<b>Sb</b>	<b>0.00071</b>

### ANEXO N° 3

## FÓRMULAS PARA EL PARÁMETRO DE PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA) Y TABLAS DE RESULTADOS.

Repetibilidad:

Media aritmética  $y = \frac{\sum y}{n}$

Desviación estándar  $S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$

Coefficiente de Variación  $CV = \frac{s}{y} * 100$

Intervalo de confianza  $IC_{(\mu)} = y \pm t_{\alpha/1,n-1} * \frac{s}{\sqrt{n}}$

### Precisión intermedia

Análisis de varianza.

Suma de cuadrados total (SCT)

$$SCT = \sum_{i=1}^a \sum_{ji}^a (y_{ij})^2 - \frac{(\sum T)^2}{\alpha r}$$

Suma de cuadrados de las ocasiones  $SC_{\alpha i}$

$$SC_{\alpha i} = \frac{(\sum A_1)^2}{r} - \frac{(\sum T)^2}{\alpha r}$$

Suma de cuadrados del error  $SC_{\varepsilon j}$

$$SC_{\varepsilon j} = \sum_{i=1}^a \sum_{ji}^a (y_{ij})^2 - \left[ \frac{\sum A_1^2 + A_2^2 + A_3^2 + \dots + A_n^2}{r} \right]$$

Cuadrados medios de las ocasiones  $CM_{\alpha i}$

$$CM_{\alpha i} = \frac{SC_{\alpha i}}{gl}$$

Cuadrados medios del error  $CM_{\epsilon j}$

$$CM_{\epsilon j} = \frac{SC_{\epsilon j}}{gl}$$

Cuadrados medios total (CMT)

$$CMT = \frac{SCT}{gl}$$

F Calculado

$$F_{cal} = \frac{CM_{\alpha j}}{CM_{\epsilon j}}$$

**Tabla 26.** Concentraciones para repetibilidad.

Concentración mg/ L	a 420 nm	Concentración
Nivel bajo 2.5	0.036	2.621
	0.035	2.556
	0.032	2.359
	0.034	2.490
	0.035	2.556
	0.034	2.490
Nivel medio 10	0.158	10.595
	0.160	10.725
	0.160	10.725
	0.160	10.725
	0.162	10.856
	0.160	10.725
Nivel alto 80	1.202	78.830
	1.221	80.072
	1.212	79.484
	1.222	80.137
	1.156	75.824
	1.224	80.268

**Tabla 27.** Datos para porcentaje de recobro para la repetibilidad.

	<b>Abs. Prom.</b>	<b>Contr. Prom.</b>	<b>desviación</b>	<b>Err. Rel. %</b>	<b>R (%) Aparente</b>	<b>CV%</b>
Nivel bajo	0.034	2.512	0.08930	0.4793	100.48	3.6
Nivel medio	0.160	10.725	0.08267	7.2549	107.25	0.8
Nivel alto	1.206	79.102	1.69351	-1.1220	98.88	2.1

**Tabla 28.** Resultados de dos analistas para cálculo de precisión intermedia

<b>Concentración mg/ L</b>	<b>Analista 1</b>		<b>Analista 2</b>	
	<b>a 420 nm</b>	<b>mg/ L</b>	<b>a 420 nm</b>	<b>mg/ L</b>
Nivel bajo 2.5	0.036	2.621	0.036	2.621
	0.035	2.556	0.035	2.556
	0.032	2.359	0.032	2.359
	0.034	2.490	0.034	2.490
	0.035	2.556	0.035	2.556
	0.034	2.490	0.035	2.556
Nivel medio 10	0.158	10.595	0.158	10.595
	0.160	10.725	0.157	10.529
	0.160	10.725	0.159	10.660
	0.160	10.725	0.157	10.529
	0.162	10.856	0.156	10.464
	0.160	10.725	0.159	10.660
Nivel alto 80	1.202	78.830	1.198	78.569
	1.221	80.072	1.201	78.765
	1.212	79.484	1.223	80.203
	1.222	80.137	1.221	80.072
	1.156	75.824	1.201	78.765
	1.224	80.268	1.223	80.203

**Tabla 29.** Datos para porcentaje de recobro Analista 1

	<b>Abs. Prom.</b>	<b>Contr. Prom.</b>	<b>desviación</b>	<b>Err. Rel. %</b>	<b>R (%) Aparente</b>	<b>CV%</b>
Nivel bajo	0.034	2.512	0.08930	0.4793	100.48	3.6
Nivel medio	0.160	10.725	0.08267	7.2549	107.25	0.8
Nivel alto	1.206	79.102	1.69351	-1.1220	98.88	2.1

**Tabla 30.** Datos para porcentaje de recobro Analista 2

	<b>Abs. Prom.</b>	<b>Contr. Prom.</b>	<b>desviación</b>	<b>Err. Rel. %</b>	<b>R (%) Aparente</b>	<b>CV%</b>
Nivel bajo	0.035	2.523	0.09009	0.9150	100.92	3.6
Nivel medio	0.158	10.573	0.07915	5.7298	105.73	0.7
Nivel alto	1.211	79.429	0.80413	-0.7135	98.96	1.0

### **Criterios**

#### **Análisis de varianza**

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Analista 1	18.0	554.0	30.8	1249.0
Analista 2	18.0	555.2	30.8	1261.4

#### Análisis de varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad ad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.034	1	0.034	<b>2.73 x10<sup>-5</sup></b>	0.996	<b>4.130</b>
Dentro de los grupos	42676.755	34	1255.199			
Total	42676.789	35				

#### ANEXO N° 4

### FÓRMULAS PARA EL PARÁMETRO DE EXACTITUD Y TABLAS DE RESULTADOS.

Media aritmética  $\bar{x} = \frac{\sum y}{n}$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

Intervalo de confianza

$$IC(\mu) = \bar{x} \pm t_{\alpha/2, n-1} * \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Calculo de porcentaje de recuperación aparente.

Sesgo  $b = \bar{x} - x_{ref}$

Error relativo porcentual  $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} * 100$

Recuperación aparente  $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} * 100$

Donde:

$\bar{x}$  = valor medio

$x_{ref}$  = valor de referencia

**Tabla 31.** Absorbancias en tres niveles

Concentración mg/ L	a 420 nm	mg/L	S
Nivel bajo 2.5	0.037	2.686	0.1645
	0.032	2.359	
	0.034	2.490	
Nivel medio 10	0.145	9.745	0.0984
	0.142	9.549	
	0.145	9.745	
	0.145	9.745	
	0.143	9.614	
	0.142	9.549	
Nivel alto 80	1.222	80.137	2.5291
	1.156	75.824	
	1.224	80.268	

**Tabla 32.** Datos para cantidad recuperada

	Abs. Prom.	Contr. Prom.	Sesgo	Err. Rel. %	R (%) Aparente	CV%
Nivel bajo	0.034	2.512	0.01	0.48	100.48	6.5
Nivel medio	0.144	9.658	-0.34	-3.64	96.58	1.0
Nivel alto	1.201	78.743	-1.26	-1.57	98.43	3.2

**Tabla 33.** Datos de intervalos de confianza

<b>Nivel bajo</b>	2.5120 ± 0.0775			
	Inferior	2.5895	Superior	2.4344
<b>Nivel Medio</b>	9.6580 ± 0.0464			
	Inferior	9.7043	superior	9.6116
<b>Nivel Alto</b>	78.7429 ± 1.1922			
	Inferior	79.9352	superior	77.5507

## ANEXO N° 5

### TABLAS DE RESULTADOS EN MUESTRAS DE SEMILLA CRUDA

*Tabla 34. Concentraciones de muestras en semilla cruda.*

Muestra	Absorbancia	mg/L	mg Q/g
GEN-C	0.070	4.843	0.048
	0.068	4.712	0.047
	0.067	4.647	0.046
GEN-CM	0.158	10.595	0.106
	0.161	10.791	0.108
	0.165	11.052	0.111
GEN-H1	0.349	23.078	0.231
	0.350	23.144	0.231
	0.324	21.444	0.214
GEN-H2	0.453	29.876	0.299
	0.458	30.203	0.302
	0.456	30.072	0.301
GEN-H3	0.297	19.680	0.197
	0.307	20.333	0.203
	0.328	21.706	0.217

#### Análisis de varianza.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
GEN C	3	0.141	0.047	0.000001
GEN CM	3	0.325	0.10833333	6.3333E-06
GEN H1	3	0.676	0.22533333	9.6333E-05
GEN H2	3	0.902	0.30066667	2.3333E-06
GEN H3	3	0.617	0.20566667	0.00010533

**Tabla 35.** Análisis de varianza para muestras de semilla en crudo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.12019693	4	0.03004923	<b>710.9</b>	<b>3.1607x10<sup>-12</sup></b>	<b>3.48</b>
Dentro de los grupos	0.00042267	10	4.226710 <sup>-5</sup>			
Total	0.1206196	14				

### Prueba Tukey

A partir del software estadístico minitab, se determinó que medias de grupo son significativamente diferentes entre si.

**Tabla 36.** Información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para semilla cruda.

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
GEN H2	3	0.30066	A
GEN H1	3	0.22533	B
GEN H3	3	0.20567	C
GEN CM	3	0.10833	D
GEN C	3	0.04700	E

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## ANEXO N° 6

### TABLAS DE RESULTADOS EN MUESTRAS DE LICOR.

**Tabla 37.** Concentraciones en muestras de licor.

Muestra	Absorbancia	mg/L	mg Q/g
GEN-C	0.392	25.889	0.259
	0.389	25.693	0.257
	0.392	25.889	0.259
GEN-CM	0.563	37.065	0.371
	0.571	37.588	0.376
	0.568	37.392	0.374
GEN-H1	1.116	73.209	0.732
	1.128	73.993	0.740
	1.135	74.451	0.745
GEN-H2	1.188	77.915	0.779
	1.195	78.373	0.784
	1.203	78.895	0.789
GEN-H3	0.618	40.660	0.407
	0.622	40.922	0.409
	0.615	40.464	0.405

#### Análisis de varianza.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
GEN C	3	0.775	0.258	1.33E-06
GEN CM	3	1.121	0.374	6.33E-06
GEN H1	3	2.217	0.739	4.30E-05
GEN H2	3	2.352	0.784	2.50E-05
GEN H3	3	1.221	0.407	4.00E-06

**Tabla 38.** Análisis de varianza para muestras de licor.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.66006027	4	0.16501507	<b>10,356.6</b>	<b>4.9108 x10<sup>-18</sup></b>	<b>3.48</b>
Dentro de los grupos	0.00015933	10	1.5933E-05			
Total	0.6602196	14				

### Prueba de Tukey

A partir del software estadístico minitab, se determinó que medias de grupo son significativamente diferentes entre sí.

**Tabla 39.** Información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para licor.

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
GEN H2	3	0.78400	A
GEN H1	3	0.73900	B
GEN H3	3	0.40700	C
GEN CM	3	0.37367	D
GEN C	3	0.258333	E

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## ANEXO N° 7

### TABLAS DE RESULTADOS EN MUESTRAS DE CHOCOLATE.

*Tabla 40. Concentraciones en muestras de chocolate*

Muestra	Absorbancia	mg/L	mg Q/g
GEN-C	0.337	22.294	0.223
	0.333	22.033	0.220
	0.341	22.556	0.226
GEN-CM	0.464	30.595	0.306
	0.459	30.268	0.303
	0.457	30.137	0.301
GEN-H1	0.682	44.843	0.448
	0.701	46.085	0.461
	0.714	46.935	0.469
GEN-H2	0.815	53.536	0.535
	0.788	51.771	0.518
	0.807	53.013	0.530
GEN-H3	0.429	28.307	0.283
	0.43	28.373	0.284
	0.428	28.242	0.282

#### Análisis de varianza.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
GEN C	3	0.669	0.223000	0.000009
GEN CM	3	0.91	0.303333	0.000006
GEN H1	3	1.378	0.459333	0.000112
GEN H2	3	1.583	0.527667	0.000076
GEN H3	3	0.849	0.283000	0.000001

**Tabla 41.** Análisis de varianza para muestras de chocolate

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.19765693	4	0.04941423	<b>1,205.2</b>	<b>2.2765 x10<sup>-13</sup></b>	<b>3.48</b>
Dentro de los grupos	0.00041	10	0.000041			
Total	0.19806693	14				

### Prueba de Tukey

A partir del software estadístico minitab, se determinó que medias de grupo son significativamente diferentes entre sí.

**Tabla 42.** Información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% para chocolate.

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media Agrupación</b>
GEN H2	3	0.52767 A
GEN H1	3	0.45933 B
GEN CM	3	0.30333 C
GEN H3	3	0.283000 D
GEN C	3	0.22300 E

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*