



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**PROYECTO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TEMA:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE FRACCIONES DE
COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DE *THEOBROMA*
CACAO DE LA VARIEDAD CCN51, EN *SALMONELLA* Y *E. COLI*.**

AUTORES:

**CARRILLO PILLIGUA JENNIFER VANESSA
PILLIGUA DELGADO CRISTHIAN JAVIER**

TUTOR:

DR. STALIN GUSTAVO SANTACRUZ TERAN Mgs. SC

MANTA-MANABÍ-ECUADOR

2019

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Los Honorables Miembros del tribunal Examinador luego del debido análisis y su cumplimiento de la Ley aprueban el informe de investigación sobre el tema:
“EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE FRACCIONES DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DE *THEOBROMA CACAO* DE LA VARIEDAD CCN51, EN *SALMONELLA* Y *E. COLI*”.

Ing. Mirabella Del Jesús Lucas Ormaza, Mg. Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL _____

Ing. Roy Leonardo Barre Zambrano, Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL _____

Ing. Christian Simón Rivadeneira Barcia, Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL _____

CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor(a) de la Facultad de CIENCIAS AGROPECUARIAS de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, certifico:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la modalidad de tesis, cuyo tema del proyecto es “**Evaluación del efecto inhibitorio de fracciones de compuestos fenólicos de la cáscara de *Theobroma cacao* de la variedad CCN51, en *Salmonella* y *E. Coli* ”**, el mismo que ha sido desarrollado de acuerdo a los lineamientos internos de la modalidad en mención y en apego al cumplimiento de los requisitos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico, por tal motivo CERTIFICO, que el mencionado proyecto reúne los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometido a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

La autoría del tema desarrollado, corresponde a la Srta. **Jennifer Vanessa Carrillo Pilligua** y al Sr. **Cristhian Javier Pilligua Delgado**, estudiantes de la carrera de **Ingeniería Agroindustrial**, período académico 2018 - 2019, quien se encuentran apto para la sustentación de su trabajo de titulación.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta, 28 de febrero de 2019.

Lo certifico,

Dr. STALIN GUSTAVO SANTACRUZ TERAN Mgs. Sc.
Docente Tutor(a)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Jennifer Vanessa Carrillo Pilligua y Cristhian Javier Pilligua Delgado declaramos bajo juramento que el trabajo de investigación “Evaluación del efecto inhibitorio de fracciones de compuestos fenólicos de la cáscara de *Theobroma cacao* de la variedad *CCN51*, en *Salmonella* y *E. coli*.” aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.

En virtud de esta declaración, nos responsabilizamos del contenido, veracidad y alcance científico de la tesis del Grado Académico en mención.

JENNIFER CARRILLO PILLIGUA

CRISTHIAN PILLIGUA DELGADO

AGRADECIMIENTO

Como prioridad en mi vida agradezco a Dios por darme salud, fortaleza, responsabilidad y sabiduría, por haberme permitido culminar un peldaño más de mis metas.

A mi madre por haber estado conmigo apoyándome en los momentos difíciles, por dedicar tiempo y esfuerzo para ser una mujer de bien, y darme excelentes consejos en mi caminar diario y su amor incondicional. A mis hermanos para seguir adelante en mi vida profesional.

De manera especial a estos seres queridos que ya no están conmigo que me cuidan y me protege desde el cielo, mi padre y mi querida abuela "Tule", por haberme transmitido sus mejores consejos, enseñanzas y amor absoluto, siempre los llevare en mi corazón.

A mi compañero de tesis por brindarme su sincera y valiosa amistad, a lo largo de esta trayectoria de carrera y poder llegar juntos en esta etapa de culminación.

A mis compañeros por estar allí siempre apoyándome y ayudándonos mutuamente, por su amistad y confianza.

A mis profesores, por sus conocimientos compartidos durante esta etapa universitaria, por transmitir sabiduría para mi formación profesional.

Y de manera muy especial por su esfuerzo, dedicación, colaboración y sabiduría a mi tutor Dr. Stalin Santacruz en esta trayectoria de tesis.

JENNIFER CARRILLO PILLIGUA

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a Dios a quién amo y admiro; a mi madre por su noble dedicación y amor, por ser la voz y bendición de Dios como prioridad en mi vida. A mis seres queridos en el cielo mi padre y mi abuela “Tule” por sus consejos y enseñanzas, que con esfuerzo y dedicación puedo lograr lo que me proponga, que los amo infinitamente que este esfuerzo es por ellos.

JENNIFER CARRILLO PILLIGUA

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme fuerza y salud para mí y los miembros de mi familia, por la luz en los momentos de oscuridad y por todas las bendiciones que me brindo a lo largo de este camino.

A mis padres por ser un pilar fundamental en toda mi vida estudiantil, por el esfuerzo y dedicación cada día, por los valores enseñados que hoy difícilmente se ven en la juventud, por la motivación para no desistir en esta meta que es el mejor regalo que ellos me pudieran hacer.

A mi compañera de vida por estar allí en esta última etapa que han sido momentos difíciles y que con sus palabras y aliento no me ha dejado flaquear frente a las adversidades que nos presentan en la vida.

A mi compañera de tesis por la dedicación, constancia y sobre todo el esfuerzo que hemos hecho no solo en esta última etapa sino en toda la trayectoria de la carrera para ayudarnos de manera mutua, desinteresada y que a pesar de las diferencias estoy seguro que no podría haber mejor compañera.

A mis familiares y compañeros por estar allí siempre apoyándome y ayudándonos mutuamente.

A mis profesores por sus conocimientos compartidos durante esta etapa universitaria.

A mi tutor Ing. Stalin Santacruz por su dedicación, orientación, conocimientos y su paciencia en toda la trayectoria de tesis.

CRISTHIAN PILLIGUA DELGADO

DEDICATORIA

Dedico de manera exclusiva este trabajo a mis padres que siempre me inspiraron para poder cumplir este sueño, a mi compañera de vida por estar allí en los momentos más difíciles, a mi compañera de tesis porque a pesar de las adversidades hemos sacado este proyecto adelante y demás familiares por brindarme su apoyo en esta etapa universitaria, a mis amigos donde siempre encontré respaldo y confianza para seguir adelante.

CRISTHIAN PILLIGUA DELGADO

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	MARCO TEÓRICO.....	2
1.1.1	<i>Theobroma cacao</i>	2
1.1.2	Producción del cacao en el Ecuador.....	2
1.1.3	Cáscara de cacao.....	3
1.1.4	Compuestos presentes en la cáscara de cacao.....	3
1.1.5	Compuestos fenólicos.....	3
1.1.5.1	Clasificación general.....	4
1.1.5.2	Compuestos fenólicos del cacao.....	4
1.1.6	Efectos de inhibición de los compuestos fenólicos en alimentos.....	5
1.1.7	Microorganismos patógenos para el estudio.....	5
1.1.8	<i>Salmonella spp.</i>	5
1.1.9	<i>E. coli</i>	6
1.1.10	Cromatografía de adsorción.....	7
1.2	PROBLEMA.....	8
1.3	JUSTIFICACIÓN.....	9
2.	HIPÓTESIS.....	10
3.	OBJETIVOS.....	10
3.1	Objetivo general.....	10
3.2	Objetivos específicos.....	10
4.	MÉTODOLOGIA.....	11
4.1	Variables.....	11
4.1.1	Variables independientes.....	11
4.1.2	Variable dependiente.....	11
4.2	Diseño experimental.....	12
4.2.1	Tipo de diseño.....	12
4.2.2	Análisis estadístico.....	12
4.3	Tratamientos.....	13
4.4	Métodos de análisis.....	14
4.4.1	Obtención y preparación de la materia prima.....	14

4.4.2	Extracción de compuestos fenólicos de cacao (CCN51)	14
4.4.3	Separación de los compuestos fenólicos	15
4.4.4	Análisis del efecto inhibitorio en <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> (método de difusión en agar <i>Salmonella spp</i> y <i>E. coli</i>)	16
4.4.5	Análisis de inhibición de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> por sembrado en profundidad de fracciones de compuestos fenólicos de cacao	16
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1	Extracción de compuestos fenólicos totales de cacao <i>CCN51</i> y separación de compuestos fenólicos.	17
5.2	Análisis de la actividad antimicrobiana en <i>Salmonella spp</i> y <i>E. coli</i>	18
5.3	Análisis de inhibición contra <i>Salmonella</i> y <i>E.coli</i> por sembrado en profundidad de fracciones de compuestos fenólicos cacao <i>CCN51</i>	19
6.	CONCLUSIONES	21
7.	RECOMENDACIONES	22
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
9.	ANEXOS	26

RESUMEN

El *Theobroma cacao* de la variedad CCN51 forma una parte importante en la agricultura del Ecuador ya sea para la exportación o la industrialización, el procesamiento del cacao genera grandes cantidades de subproductos agroindustriales tales como la cáscara que son desaprovechados o subutilizados. El presente trabajo de investigación se realizó enfocándose en la separación de compuestos fenólicos de la cáscara del *Theobroma cacao* de la variedad CCN51 que nos facilite en el control de microorganismos patógenos presente en los alimentos, inhibiendo su crecimiento. La extracción de compuestos fenólicos se la realizó utilizando como solvente etanol. Para la cromatografía de adsorción se empleó una columna con resina HBL, utilizando como eluyente cloroformo y recogiendo seis fracciones de 5 gotas cada una. La separación de los compuestos por cromatografía de adsorción se realizó en un tiempo de 4.13 min y dio como resultado 6 fracciones de 5 gotas cada una. No se observó diferencia en el poder inhibitorio de las fracciones obtenidas contra *Salmonella* ni *E. coli*. El efecto de inhibición analizado por el método de difusión reveló que este fue mayor en *E. coli*, en comparación con *Salmonella*. Por medio de análisis de sembrado en profundidad no se observó presencia de *Salmonella* mientras que si hubo presencia de *E. coli*, luego de 24 horas. Los resultados posiblemente indican que el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre *Salmonella* fue más duradero que sobre *E. coli*.

Palabras claves

Theobroma cacao, inhibición, conservación, compuestos fenólicos, *E. coli*, *Salmonella*, diferencia significativa, cromatografía de adsorción

ABSTRACT

Theobroma cacao of the CCN51 variety forms an important part in Ecuador's agriculture either for export or industrialization. Cocoa processing generates large quantities of agroindustrial by-products such as husk that are wasted or underutilized. The present research work was carried out focusing on the separation of phenolic compounds from the *Theobroma cacao* shell of the CCN51 variety that may help to control pathogenic microorganisms present in food, inhibiting their growth. The extraction of phenolic compounds was carried out using ethanol as solvent. For the adsorption chromatography, a column with HBL resin was used, using chloroform as eluent and collecting six fractions of 5 drops each. The separation of the compounds by adsorption chromatography was carried out in a time of 4.13 min and resulted in 6 fractions of 5 drops each. No difference was observed in the inhibitory power of the fractions obtained against *Salmonella* or *E. coli*. The inhibition effect analyzed by the diffusion method revealed that this was higher in *E. coli*, compared to *Salmonella*. Microbiological analyses also found no presence of *Salmonella* and presence of *E. coli*, both after 24 hours. The results possibly indicate that the inhibitory effect of the phenolic compounds on *Salmonella* was more durable than on *E. coli*.

Keywords

Theobroma cocoa, inhibition, conservation, phenolic compounds, *E. coli*, *Salmonella*, significant difference, adsorption chromatography.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente Ecuador la producción y elaboración de productos que tienen como materia prima el cacao genera miles cantidades de residuos ya que por lo regular se utiliza la semilla y la demás partes quedan como desperdicios generando así un gran impacto ambiental, el uso de antimicrobianos en los alimentos en la industria alimentaria es común ya que por mucho tiempo se han utilizado estos antimicrobianos sintetizados químicamente que si se utiliza en gran cantidad causa daños a la salud del consumidor en donde la mayoría de las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos tiene que ver con la presencia de microorganismos patógenos como son la *Salmonella* y *E. coli*, estas bacterias ha sido un punto blanco para muchos estudios para asegurar la calidad en la industria de los alimentos.

Hoy en día existe varios artículos donde manifiestan un gran interés de los compuestos fenólicos que se encuentra en la cáscara de *Theobroma cacao* que logrando extraer estos compuestos que posee capacidad de antioxidante antimicrobiana y antifúngica que permite inhibir los microorganismos patógenos y de esta forma darle un valor agregado a estos desperdicios agroindustriales, de tal manera que se han generado nuevas alternativas para su inhibición y eliminación y una de esta es el uso de sustancia de origen natural misma que pueden tener menos efectos adverso a la salud en relación a los métodos tradicionales que se usan y así mismo se pueden utilizar esta sustancia más natural siendo beneficioso para la salud del consumidor.

El trabajo consistió realizar la evaluación del efecto inhibitorio de fracciones de compuestos fenólicos de la cáscara de *Theobroma cacao* de la variedad CCN51 sobre *Salmonella* y *E. coli*, que estos microorganismo son los deterioro de alimentos. Por lo tanto se procedió a extraer el contenido de compuestos fenólicos presentes en la cáscara de cacao y después separar los compuestos fenólicos por cromatografía de adsorción, y por último se analiza el efecto inhibitorio de las fracciones de compuestos fenólicos obtenidas por cromatografía contra *Salmonella* y *E. coli*.

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 *Theobroma cacao*

El cacao es un árbol originario de la región comprendida entre América central y América del sur, es también conocido por su nombre científico de origen griego *Theobroma cacao* L., el cual significa “comida de los dioses”. El árbol crece a una altura de aproximadamente 4 a 5 m y el tiempo que se demora en producir frutos es de 5 años, dependiendo de la especie de cacao y de las condiciones presentes en la zona de cultivo. Su cotizado fruto, conocido también como mazorca, mide entre 10 y 30 cm de largo y 8 y 10 cm de ancho, con forma de haba alargada, tiene aspecto leñoso y crece debajo de las ramas (Hernández 2015).

En su interior se encuentran entre 20 y 30 semillas en forma de almendra rodeadas por una pulpa agrídulce y gelatinosa, con una longitud de 2-3 cm y ancho de 1.2-1.6 cm. Cuando el fruto alcanza la madurez es recogido, sus semillas son extraídas, fermentadas y secadas, obteniendo como resultado un grano de color oscuro, de agradable olor y sabor (Hernández 2015).

1.1.2 Producción del cacao en el Ecuador

Actualmente en el Ecuador hay gran producción de cacao que es un producto que posee gran característica de aroma y sabor nobles siendo exportada a otros países del mundo según lo expresa Rodríguez (2013), y que en su investigación del cacao CCN51 que el país exporta, cacao en granos y semielaborados por sus nobles características siendo esta de gran importancia para la economía del Ecuador con el pasar el tiempo.

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se encuentran mayormente en el Litoral y en la Amazonía, es un árbol con flores pequeñas que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcar. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el país se cultivan dos tipos de cacao:

el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional también conocido como cacao de fino aroma (Guerrero 2015).

1.1.3 Cáscara de cacao

La cáscara de cacao es considerado como un desecho agroindustrial en la producción ya que solo una parte de estos desechos se utiliza como abono agrícola y el resto es desechado o incinerados y esto tiene un gran impacto en el medio ambiente, varios estudios han propuestos diversas aplicaciones para el uso de la cascara entre las que se destacan el obtener compuestos fenólicos ya que se encuentran en gran cantidad en la cáscara de cacao (Ardila *et al.* 2011).

1.1.4 Compuestos presentes en la cáscara de cacao

Hoy en día se han visto en varios artículos donde manifiestan que la cáscara de cacao posee capacidad antioxidante, antimicrobiana y anti fúngica, que permite inhibir los microorganismos patógenos tales como *Salmonella spp* y *E. coli* expresado por Rivas (2016), que en anteriores trabajos han identificado la presencia de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en la cáscara de cacao y corroborado por Cruz *et al.* (2016). El grano, las hojas y la cáscara de cacao han sido objeto de diversos estudios por la presencia de compuestos fenólicos en los cuales constituye un grupo diverso tales como tanino, flavonoides, antocianina, y algunos compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

1.1.5 Compuestos fenólicos

El término compuestos fenólicos engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, se encuentran casi en todos los alimentos de origen vegetal, además influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor.

Gimeno (2004). Según los últimos estudios se ha demostrado que consumir compuestos fenólicos ayuda a la mejora de la salud y a disminuir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Quiñonez *et al.* 2012).

1.1.5.1 Clasificación general

Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural. Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos:

No flavonoides

Entre ellos hay dos subgrupos:

- ✓ Fenoles no carboxílicos:
- ✓ Ácidos fenoles

Flavonoides

Formados por

- ✓ Antocianos.
- ✓ Flaconas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- ✓ Flavanoles, taninos condensados y lignanos.

(Gimeno 2004)

1.1.5.2 Compuestos fenólicos del cacao

Los principales compuestos fenólicos presentes en las almendras de cacao se localizan en tres grupos, las catequinas o flavan 3-ol que representan el 37% del total; las antocianinas con cerca del 4% y las proantocianidinas con el 58%. Del primer grupo, la epicatequina es casi la única molécula que compone el grupo (cerca del 98% del total de catequinas) (Vásquez *et al.* 2016).

La cáscara de cacao nutricionalmente aporta como todo alimento con macronutrientes (proteínas, carbohidratos, lípidos) y micronutrientes (vitaminas y

minerales). Este desecho agro-industrial se considera como una fuente baja de energía debido a que presenta aportes de energía menor a 2.5 kcal/g (Tapia 2015).

1.1.6 Efectos de inhibición de los compuestos fenólicos en alimentos

Los polifenoles tienen diversas propiedades y características únicas, entre las cuales se encuentran la capacidad para actuar como antioxidante, además de actividad antimicrobiana y antimutagénica. Debido a su propiedad antioxidante tienen la capacidad de retardar o impedir la oxidación de los alimentos (5), mientras que en las personas la ingesta de antioxidantes tenga efectos positivos, debido a que previene el desarrollo de enfermedades crónicas las cuales tienen como factor desencadenante el daño oxidativo, tales como alzhéimer, cáncer, etc. (Hernández 2015).

1.1.7 Microorganismos patógenos para el estudio

La transmisión de enfermedades producida por el consumo de alimentos es un fenómeno muy conocido en todo el mundo, con los estudios realizados se ha constatado el incremento de las enfermedades por consumir alimentos contaminados con diferentes microorganismos patógenos. De este modo se han producido fenómenos mundiales tales como la reaparición del cólera epidémico, el aumento de la frecuencia de *Salmonella spp* vinculada al consumo de aves y huevos y la aparición de otros agentes en la transmisión a través de los alimentos como son *E. coli* que afectan a la población mundial (Oscars 2012).

1.1.8 *Salmonella spp.*

Es un bacilo Gran negativo, tiene gran impacto en salud pública; datos epidemiológicos indican que la gastroenteritis y la fiebre tifoidea son de distribución mundial. Los alimentos en los que se ha detectado principalmente este

patógeno son la carne de pollo, carne de cerdo, carne de pavo, productos con carne cruda, huevos y jamón de cerdo. Los métodos para la detección de esta bacteria se fundamentan en el cultivo microbiológico, pero su aislamiento se dificulta por el bajo número de células presentes en el alimento y la inhibición por otros microorganismos más competentes que puedan estar presentes (Soto *et al.* 2016).

La *Salmonella* es, desde hace tiempo, objeto de diversos estudios debido a la diversidad y peligrosidad que presenta el género, desde un principio la dificultad de clasificarlo de do varias polémicas y hay diferentes opiniones que han llevado a los investigadores a trabajar con varios sistemas y esquemas de clasificación. Con el fin de prevenir y tratar de manera eficaz esta bacteria, se han ido desarrollando, a lo largo de las últimas décadas, métodos de detección más específicos y rápidos. Además, empresas han tenido la necesidad de realizar diversos estudios con el fin de obtener resultados fiables y en menor tiempo para prevenir la contaminación de los alimentos (Robledo 2015).

1.1.9 *E. coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, que tiene un gran impacto en la salud pública y cuyo hábitat es el intestino de animales (Hurtado 2011). Ha documentado que ciertas cepas de *E. coli* producen diarrea y otras enfermedades extraintestinales e infecciones vías urinarias, mismas que pueden causar inclusive la muerte (López 2013).

La *E. coli*, es una bacteria que se encuentra comúnmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales de sangre caliente, también se encuentra en los alimentos ya que es un microorganismo patógeno que tiene un alto grado de contaminación y si no es bien tratado puede ser perjudicial para la salud humana. Las cepas de *E. coli* constituyen alrededor del 1% de la población microbiana normal del intestino. Si bien la mayoría de las cepas dentro del intestino son

agentes patógenos gastrointestinales beneficiosos para el ser humano, otros son perjudiciales (Falcones 2010).

1.1.10 Cromatografía de adsorción

La cromatografía líquida de adsorción se caracteriza por utilizar una fase estacionaria sólida (Adsorbente) de carácter polar y una fase móvil líquida (Eluyente) apolar, y se utiliza tanto con fines analíticos (identificación de sustancias) como con fines preparativos (aislamiento), siendo su limitación más importante la dificultad de separar sustancias de polaridad parecida (Castro 2005).

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria la constituye un sólido poroso finamente granulado, siendo el proceso de adsorción debido a las atracciones intermoleculares dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno entre los componentes de la muestra y el adsorbente. El adsorbente más utilizado es el gel de sílice, aunque también se utiliza alúmina. La fase estacionaria debe ser químicamente inerte con las sustancias que se pretenden separar, por lo que hay que tener en cuenta que el gel de sílice tiene carácter ácido, mientras que la alúmina puede adquirirse con carácter ácido, básico o neutro (Valcárcel *et al.* 2010).

La fase móvil está constituida por una mezcla de disolventes que deben ser, al menos, parcialmente solubles. Para una fase móvil determinada, cuanto más polar sea la sustancia de la muestra, más va a ser retenida por la fase estacionaria (o menos arrastrada por la fase móvil), mientras que por lo que respecta a la velocidad de elución de una sustancia determinada, depende de la naturaleza de la fase móvil: cuanto más polar sea la fase móvil más se desactivará la fase estacionaria y, por lo tanto, menos retenida quedará la sustancia en cuestión, recogiendo en el cuadro adjunto una relación de los disolventes más utilizados en esta tipo de cromatografía. (Valcárcel *et al.* 2010).

1.2 PROBLEMA

En la actualidad Ecuador la producción y elaboración de productos que tienen como materia prima el cacao ha generado miles de cantidades de residuos ya que por lo general solo se utiliza la semilla y las demás partes quedan como desperdicios que comúnmente son desechados o quemados ocasionando un gran impacto negativo al medio ambiente, para el aprovechamiento de estos residuos recientes estudios han demostrado que la cáscara de *Theobroma cacao* tiene grandes propiedades de compuestos fenólicos los cuales pueden ser aplicado como una alternativa a la conservación de alimentos para poder sustituir los antioxidantes e inhibitorios obtenidos de manera sintéticas (Rivas 2016).

El uso de antimicrobianos en los alimentos es una práctica común en la industria de los alimentos, durante mucho tiempo se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente que si son utilizados en grandes cantidades causan daño a la salud de los consumidores, por esto con el paso del tiempo los consumidores han incrementado el rechazo a consumir alimentos procesados, por lo cual las industrias alimentarias han buscado diferentes alternativas de origen natural para sustituir los antimicrobiano sintetizados químicamente (Sauceda 2011).

Las enfermedades de transmisión alimentaria son uno de los principales problemas de salud, el uso de antimicrobianos sintetizados químicamente en la industria de los alimentos es una práctica común, una de las alternativas actuales para el control de la proliferación de microorganismos patógenos es la extracción de compuestos fenólicos que se encuentran presentes en diversas plantas por ejemplo el cacao debido a su potencial como sustituto a los antimicrobianos sintéticos y además por su actividad antioxidante (Sánchez 2012).

1.3 JUSTIFICACIÓN

Para la industria cacaotera del Ecuador deshacerse de los desechos agroindustriales generados durante la elaboración de chocolate y sus derivados representa un problema ya que no se tiene conocimientos para sacarle el máximo provecho ya que en la actualidad existe un interés por el estudio de alimento con un alto contenido de antimicrobiano, tales como son los compuestos fenólicos los cuales se encuentran en una gran variedad ya que estos constituyen uno de los mayores grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal y cuyo consumo se ha asociado con una disminución en la aparición de enfermedades cardiovasculares así como el cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas que actualmente están en crecimiento (Quiñones *et al.* 2013).

Tenemos en cuenta que a la cáscara de cacao se les puede extraer compuestos fenólicos, los cuales tiene una gran capacidad antioxidantes, y de esta forma darle un valor agregado a estos desechos agroindustriales, además que se ha demostrado que son beneficiosos para la salud humana, se ha demostrado que los antimicrobianos sintetizados químicamente tienen un potencial riesgo para la salud humana, por esta razón se pretende utilizar los compuestos fenólicos como un sustituto más natural, ya que esto conlleva a correr con menos riesgo a la salud humana (Hernández 2015).

Las mayorías de las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos tienen que ver con la presencia de microorganismos patógenos como son la *Salmonella* y el *E. coli*, estas bacterias han sido el blanco de muchos estudios para el aseguramiento de la calidad de las industrias alimentarias y se ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para su inhibición y su eliminación. Una de estas alternativas es el uso de sustancias de origen natural mismas que pueden tener menos efectos adversos a la salud, en relación a las usadas en métodos tradicionales (Oscars 2012).

2. HIPÓTESIS

Las fracciones de compuestos fenólicos, de *Theobroma cacao*, obtenidas por cromatografía de adsorción tendrán efecto inhibitorio en *Salmonella* y *E. coli*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de fracciones de compuestos fenólicos de la cáscara de *Theobroma cacao* de la variedad *CCN51* sobre *Salmonella* y *E. coli*

3.2 Objetivos específicos

1. Extraer los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de cacao y separarlos por cromatografía de adsorción
2. Analizar si las fracciones de compuestos fenólicos obtenidas por cromatografía tienen efecto inhibitorio contra *Salmonella* y *E. coli*

4. MÉTODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de Ciencia de Alimentos de la Facultad Ciencias Agropecuaria de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, el cual se encuentra ubicado en la ciudad de Manta en la vía de San Mateo.

4.1 Variables

4.1.1 Variables independientes

A. Fracciones de compuestos fenólicos

Fracción F1 de compuestos fenólicos

Fracción F2 de compuestos fenólicos

Fracción F3 de compuestos fenólicos

Fracción F4 de compuestos fenólicos

Fracción F5 de compuestos fenólicos

Fracción F6 de compuestos fenólicos

B. Tipo de microorganismo patógenos

Salmonella

E. coli

4.1.2 Variable dependiente

Zona inhibición (mm).

4.2 Diseño experimental

4.2.1 Tipo de diseño

Para este estudio se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo bifactorial.

4.2.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ADEVA y la prueba de comparación de medias de acuerdo al Test de Tukey al 5%. Todos los datos se analizaron por triplicado y los resultados fueron procesados por el programa Infostat 2016.

Análisis de varianza (ADEVA) del diseño experimental

Tabla 1. Esquema de análisis de varianza (ADEVA)

Fuente de variación		G.L
Total	$(t \cdot r - 1)$	35
Tratamientos	$(t - 1)$	11
Repetición	$r - 1$	2
Factor A	FA-1	5
Factor B	FB-1	1
Interacción (AxB)	(FAxFB)	5
Error experimental	$(t - 1)(r - 1)$	22

Elaborado por: Carrillo, V y Pilligua, C (2019)

4.3 Tratamientos

En esta investigación se utilizaron doce tratamientos que se detallan a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos utilizados en la investigación

Tratamiento	Fracciones de compuestos fenólicos	Tipo de microorganismo patógenos
T1	F1	<i>Salmonella</i>
T2	F2	<i>Salmonella</i>
T3	F3	<i>Salmonella</i>
T4	F4	<i>Salmonella</i>
T5	F5	<i>Salmonella</i>
T6	F6	<i>Salmonella</i>
T7	F1	<i>E. coli</i>
T8	F2	<i>E. coli</i>
T9	F3	<i>E. coli</i>
T10	F4	<i>E. coli</i>
T11	F5	<i>E. coli</i>
T12	F6	<i>E. coli</i>

Elaborado por: Carrillo, V y Pilligua, C (2019)

4.4 Métodos de análisis

4.4.1 Obtención y preparación de la materia prima

La materia prima, cacao variedad CCN51, se obtuvo en la finca de propiedad del Sr. Roque Avellán de la parroquia Quiroga, cantón Bolívar (Calceta) de la provincia de Manabí. El material se secó a una temperatura de 70 °C hasta obtener peso constante. Posteriormente, el material se desintegró en un molino manual (Corona Landers y Cía. Nacional / Colombia).

El patógeno *Salmonella* ya nutrido se lo obtuvo en el Laboratorio de Investigación de Ciencia de Alimentos de la Facultad Ciencias Agropecuaria de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

La cepa de *E. coli* se obtuvo en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí.

4.4.2 Extracción de compuestos fenólicos de cacao (CCN51)

La extracción se realizó en base al método propuesto por Vivanco *et al.* (2017). Se pesó 5 gramos de cacao, mismos que fueron mezclados con etanol (95% v/v) y sometidos a agitación de 125 rpm por 24 horas a temperatura de 27 °C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 4,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se filtró con ayuda de una bomba de vacío. Para conocer la cantidad de los compuestos fenólicos presentes en la solución obtenida, se la sometió a evaporación por 48 horas a temperatura 27 °C. El material obtenido se almacenó para posteriores análisis.

4.4.3 Separación de los compuestos fenólicos

Se tomó una columna (RENSA HLB / MIP Technologies, Suecia) y se procedió a introducir un soporte en el fondo de la misma. Se pesaron 0.2 g de resina HLB (MIP Technologies, Suecia) la misma que se introdujo en la columna en estado sólido, y se le agregó agua destilada para que la resina compacte en la columna. Es necesario indicar que a lo largo del proceso cromatográfico la columna nunca debe “secarse”, esto es, la fase estacionaria debe encontrarse en todo momento cubierto por la fase móvil, ya que de lo contrario la fase estacionaria se contraería y agrietaría (Benítez 2015).

Una vez preparada la columna, se procedió a hidratar la columna añadiendo 1 ml de cloroformo, una vez que este ha eluido se añadió 1 ml de compuestos de fenólicos, en la superficie de la parte superior del adsorbente contenido en la columna con la ayuda de una micropipeta. Para evitar que se deforme la superficie del adsorbente durante la adición, se procedió a depositar la muestra en la pared interior de la columna. Esto permitió que la muestra resbale hasta la superficie del adsorbente propuesto por Benítez, (2015).

Una vez inyectada la muestra, se llenó la parte superior libre de la columna con 1 ml de cloroformo estableciendo un flujo continuo del mismo (fase móvil). Se van tomando fracciones de 5 gotas cada una dando un total de 6 fracciones (Benítez 2015).

Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en cada fracción se procedió a evaporar el cloroformo presente en las fracciones por 30 minutos y pesar el material restante (Benítez 2015).

4.4.4 Análisis del efecto inhibitorio en *Salmonella* y *E. coli* (método de difusión en agar *Salmonella spp* y *E. coli*)

Como análisis de control, se empleó el método de agar Shigella según la técnica estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2009). Discos de papel se sumergieron en las fracciones de compuestos fenólicos por 10 segundos, luego de ello se retiraron y se dejaron secar por 10 segundos para proceder inmediatamente a colocar los discos en las cajas Petri previamente inoculadas con *Salmonella* o *E. coli* sobre el medio de cultivo agar Shigella, las cajas se incubaron a 27 °C por 24 horas. Al final de ese tiempo se midió los halos de inhibición, de acuerdo a lo expresado por Benítez (2015).

4.4.5 Análisis de inhibición de *Salmonella* y *E. coli* por sembrado en profundidad de fracciones de compuestos fenólicos de cacao

En el análisis de inhibición por sembrado en profundidad se realizó haciendo una mezcla de cada fracción de compuestos fenólicos del cacao con 12 ml del medio de cultivo (agar shigella). Luego de que esta mezcla gelificó se procedió a la inoculación de *Salmonella* o *E.coli*, y a la incubación a 27 °C por 24 horas, para su posterior conteo de colonias (García *et al.* 2017).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción de compuestos fenólicos totales de cacao CCN51 y separación de compuestos fenólicos.

Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizó 5 g de cáscara de cacao, a partir de los cuales se obtuvo 0.0763 g de compuestos fenólicos. Otros trabajos reportan extracciones de 0.06893 g (Sotelo *et al.* 2015) y 0.0572 g (Nazario *et al.* 2013) de compuestos fenólicos, ambos a partir de 5 g de cascara de cacao, en variedades procedentes de Costa de Marfil y América del Sur, respectivamente. Ambos valores son similares a los obtenidos en la presente investigación.

Luego de la extracción, se procedió a realizar la separación por cromatografía de absorción en 6 fracciones, cuyos pesos fueron mayores para las dos primeras fracciones (Tabla 3), según Méndez (2011), reporta que en su investigación utilizó etanol obteniendo separaciones de fracciones por afinidad relativa de los compuestos con la fase estacionaria y así mismo concuerda Muñoz *et al.* (2014), expresa que en su investigación utilizó distintas muestras de miel y obtuvo como mejor resultado la miel silvestre.

Tabla3. Tiempo de elución de las fracciones de compuestos fenólicos

Números fracciones	Tiempo de elución (minutos)	Volumen de fracción (gotas)	Peso de compuestos fenólicos por cada fracción (g)
F 1	0-1.51	5	0.0189
F2	1.51-2.51	5	0.0402
F3	2.51-2.98	5	0.0010
F4	2.98-3.39	5	0.0006
F5	3.39-3.77	5	0.0006
F6	3.77-4.13	5	0.0005
TOTAL		30	0.0618

Elaborado por: Carrillo, V y Pilligua, C (2019)

5.2 Análisis de la actividad antimicrobiana en *Salmonella spp* y *E. coli*

En la tabla 4 se puede observar que no hubo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las seis fracciones de compuestos fenólicos sobre *Salmonella*. Posiblemente el similar poder inhibitorio se deba a la diferente concentración de compuestos fenólicos presentes en cada fracción.

En los resultados estadísticos obtenidos en cuanto a el efecto inhibitorio de las fracciones de los compuestos fenólicos de la cáscara de cacao CCN51, frente a *Salmonella* y *E. coli*, se observó que hubo poder inhibitorio luego de las 24 horas, donde el efecto inhibitorio fue estadísticamente igual para todas las fracciones tanto para *Salmonella spp* como *E. coli* (Tablas 4 y 5). El similar poder inhibitorio posiblemente se deba a la diferente concentración de compuestos fenólicos presentes en cada fracción.

Los compuestos fenólicos del cacao CCN51 inhibieron *Salmonella* y *E. coli* luego de 24 horas de incubación. Los diámetros de inhibición estuvieron entre 9.25 y 10.33 mm para *Salmonella* y 12.16 y 19.50 mm para *E. coli*. Estos resultados se encuentran dentro del mismo rango en relación a los encontrados por Castillo (2017) para *M. citrifolia* frente a *Salmonella*, con halos de inhibición entre 9 mm y 14 mm y a los de Pastrana *et al.* (2017) en su investigación con clavo y canela que obtuvo halo de inhibición en *E. coli* de 15 mm.

En la tabla 5 se puede observar que no hubo diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las seis fracciones de compuestos fenólicos sobre *Salmonella*.

Tabla 4. Análisis de inhibición de fracciones de compuestos fenólicos sobre *Salmonella spp.* después de 24 h

Fracciones de compuestos fenólicos	Zona de inhibición (diámetro mm)	Peso de compuestos fenólicos por cada fracción (g)
F1	9.25 A	0.0189
F2	9.25 A	0.0402
F3	9.66 A	0.0010
F4	8.25 A	0.0006
F5	8.50 A	0.0006
F6	10.33 A	0.0005

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Carrillo, V y Pilligua, C (2019)

Tabla 5. Análisis de inhibición de fracciones de compuestos fenólicos sobre *E. coli* después de 24 h

Fracciones de compuestos fenólicos	Zona de inhibición (diámetro mm)	Peso de compuestos fenólicos por cada fracción (g)
F1	12.16 ^a	0.0189
F2	12.66 ^a	0.0402
F3	14.50 ^a	0.0010
F4	12.83 ^a	0.0006
F5	19.50 ^a	0.0006
F6	17.50 ^a	0.0005

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Carrillo, V y Pilligua, C (2019)

5.3 Análisis de inhibición frente a *Salmonella* y *E. coli* por sembrado en profundidad. Uso de fracciones de compuestos fenólicos cacao CCN51

En cuanto al sembrado en profundidad los resultados luego de 24 horas, no se observó presencia de *Salmonella spp* mientras si hubo crecimiento de *E. coli* (Tabla 6).

Los resultados aparentemente opuestos (Tablas 4, 5 y 6) posiblemente se deban a una dilución de los compuestos fenólicos en el medio de cultivo, dilución que no permitió el desarrollo en *Salmonella spp*, mientras que si hubo crecimiento de *E. coli*. Esto podría comprobarse con la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo. Vélez (2016).

Tabla 6. Análisis de inhibición contra *Salmonella* y *E.coli* por sembrado en profundidad de fracciones de compuestos fenólicos cacao CCN51 después de 24 h

Número de fracciones	<i>Salmonella</i>	<i>E. Coli</i>
F 1	NO	SI
F2	NO	SI
F3	NO	SI
F4	NO	SI
F5	NO	SI
F6	NO	SI

Elaborado por: Carrillo, V y Pilligua, C (2019)

6. CONCLUSIONES

La extracción alcohólica de los compuestos fenólicos de la cáscara de *Theobroma cacao* CCN51 permitió obtener un peso de 0,0763 g a partir de 5 g de cáscara de cacao. La separación de los compuestos por cromatografía de adsorción se realizó utilizando como fase estacionaria (RENSA HLB 2001) y fase móvil (cloroformo). El proceso de separación se realizó en un tiempo de 4.13 min y como resultado 6 fracciones con pesos por fracción entre 0.0005 a 0.0402 g.

No hubo diferencia estadística en el poder inhibitorio de las fracciones frente a *Salmonella spp* y *E. coli*, con halos de inhibición de mayor diámetro para *E. coli* en relación a *Salmonella*.

El efecto de inhibición realizado por el método de difusión hubo mayor formación de halo en *E. coli*, en comparación del Halo en *Salmonella spp*.

Por medio el análisis de sembrado en profundidad no se observó presencia de *Salmonella spp* mientras que si hubo presencia de *E. coli*, después de 24 horas. Los resultados posiblemente indican una dilución de los compuestos fenólicos en la preparación del medio de cultivo, misma que inhibió el crecimiento de *E. coli* y no de *Salmonella*.

7. RECOMENDACIONES

Realizar la separación de compuestos fenólicos con otro tipo de eluyentes de diferente polaridad que permita optimizar la separación de los compuestos fenólicos.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ardila, C. Carreño, S. (2011). Cáscara de cacao. Aprovechamiento de la cáscara de la mazorca de cacao como adsorbente. Bucaramanga – Colombia. Pp 59.
2. Benítez, O. (2015). Cromatografía líquida de adsorción en columna (CC) y capa fina (TLC). Pp 11.
3. Castillo, A; Pascual, Y; Livio, C; Paz, C. & Cañete, F. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). Cuba – Habana Vol. 9 n 4.
4. Castro, L. (2005). Cromatografía de adsorción. Tipos de cromatografía. Pp 10.
5. NCCLS (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44–A2. Estados Unidos - Wayne, Pennsylvania. Vol. 29 n 17. Pp 13.
6. Cruz, C; Ángeles, A; Hernández, A; Santos, S. & Campo, R. (2016). El efecto antimicrobiano de las frutas ha sido asociado con el contenido de compuestos fenólicos. Efecto inhibitorio de bacterias patógenas con extractos de xoconostle asistidos por ultrasonido. México. Vol. 1 n 1. Pp 6.
7. Falcones, J. (2010). *E. coli*. Prevención de la *E. coli* en los alimentos. Pp 16.
8. García, S; Sánchez, E. & García, P. (2017). Análisis de inhibición por dilución. Actividad antimicrobiana. España – Barcelona. Pp 24.
9. Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Vol. 23 n.6. pp 9-25.
10. Guerrero, H. & Guillermo. (2015). Los orígenes del cacao. El Cacao ecuatoriano Su historia empezó antes del siglo XV. Pp 10.
11. Hernández, J. (2015). Compuestos fenólicos y sus capacidades de actuar. Obtención a escala laboratorio de polifenoles a partir de la cáscara de cacao y su utilidad como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles. Guayaquil – Ecuador. Pp 112.
12. Hurtado, J. (2011). *Escherichia coli*. Enfermedades Diarreicas agudas por el mal manejo de alimentos. Quito – Ecuador. Pp 32.
13. López, A; M. V. & M.S. (2013). Enfermedades producidas por *E. coli*. *Escherichia coli*: mecanismos de patogenicidad. Mexico. Pp 39.

14. Méndez, Á. (2011). Separación por fracciones. Cromatografía en columna. Pp 10.
15. Muñoz, A; Blanco, T. & Alvarado, Á. (2014). Determinación de compuestos fenólicos. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. Lima – Perú. Vol. 80 n 4.
16. Nazario, O; Ordoñez, E; Mandujano, Y. & Arévalo, J. (2013). Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*theobroma cacao* L.) Criollo y siete clones. Rev. Investigación y Amazonía. Vol. 3. N°1. pp 51-59.
17. Oscares, M. (2012). Importancia la existencia de microorganismos de carácter patógeno. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli*. y *Salmonella spp*. Valdivia – Chile. Pp 78.
18. Quiñones, J; Trujillo, R; Capdesuñer, Y; Quirós, Y. & Hernández de la Torre. (2013). Importancia del *Theobroma cacao* en la industria. Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). Cuba – Habana. Vol. 18 n 2.
19. Pastrana, Y; Durango, A. & Diofanor, C. (2017). Efecto Antimicrobiano Del Clavo Y La Canela Sobre Patógenos. Rev. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol 15 N° 1. Pp 56-65.
20. Rivas, I. (2016). Importancia en los grupos fenólicos en los alimentos de los residuos. Evaluación del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao para su aplicación como potencial agente inhibidor del pardeamiento enzimático. Ecuador – Quito. Pp126.
21. Robledo, A. (2015). *Salmonella*. Investigación de *Salmonella spp* en alimentos mediante el método tradicional ISO6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. Barcelona – España. Pp 77.
22. Rodríguez, A. (2013). Generalidades del cacao CCN51. Estudio de tres métodos para la obtención de pulpa del mesocarpio del cacao (*theobroma cacao* variedad CCN51). Ecuador – Los Ríos. Pp 106.
23. Sánchez, E. (2012). Efecto de compuestos fitoquímicos sobre microorganismos de importancia en alimentos. Pp 162.
24. Saucedo, E. (2011). Antimicrobianos alimentarios. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. México. Vol. 7 n. 1 Pp 19.

25. Sotelo, L, Alvis, A. & Arrázola, G. (2015). Obtención de los extractos y contenido de polifenoles totales. Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. Colombia – Montería. Vol. 9 n. 1. Pp 124 – 134.
26. Soto, Z, Pérez, L. & Estrada, D. (2016). *Salmonella spp.* Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Barranquilla – Colombia. Vol.32, n. 1. Pp 109.
27. Tapia, C. (2015). La cáscara de cacao nutricionalmente. Aprovechamiento de residuos agroindustriales, cáscara de cacao. Ambato – Ecuador. Pp 143.
28. Valcárcel, M. & Gómez, A. (2010). Generalidades sobre las técnicas analíticas de separación, cromatografía de absorción. Técnicas analíticas de separación. Barcelona – España. Pp 15.
29. Vivanco, E; Matute, L. & Campo, M. (2017). Extracción de compuestos fenólicos y caracterización físico-química de la cáscara de *Theobroma cacao* L, variedades Nacional y CCN-51. Machala - Ecuador. Vol. 2 n. 1. Pp 10.

9. ANEXOS

Anexos 1. Cáscara de cacao húmeda, de la variedad CCN5, en proceso de secado y molida.



Anexos 2. Separación de los compuestos fenólicos.



Anexos 3. Replicación de la cepa de *E.coli*.



Anexos 4. Análisis de inhibición en *Salmonella*.



Anexos 5. Análisis de inhibición en *E.coli*.



Anexos 6. Análisis de inhibición por sembrado en profundidad de fracciones de compuestos fenólicos cacao en *Salmonella* y *E.coli*.



Anexos 7. Análisis de la varianza de efecto inhibitorio en *Salmonella*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ZONA DE INHIBICION	31	0,18	0,02	18,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15,52	5	3,10	1,10	0,3877
FRACCIONES	15,52	5	3,10	1,10	0,3877
Error	70,87	25	2,83		
Total	86,39	30			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,28158

Error: 2,8347 gl: 25

FRACCIONES	Medias	n	E.E.
F4	8,25	4	0,84 A
F5	8,50	6	0,69 A
F1	9,25	4	0,84 A
F2	9,40	5	0,75 A
F3	9,67	6	0,69 A
F6	10,33	6	0,69 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexos 8. Análisis de la varianza de efecto inhibitorio en *E.coli*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ZONA DE INHIBICION	34	0,30	0,17	31,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	268,53	5	53,71	2,39	0,0632
FRACCIONES	268,53	5	53,71	2,39	0,0632
Error	629,00	28	22,46		
Total	897,53	33			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,70367

Error: 22,4643 gl: 28

FRACCIONES	Medias	n	E.E.
F1	12,17	6	1,93 A
F2	12,67	6	1,93 A
F4	12,83	6	1,93 A
F3	14,50	4	2,37 A
F6	17,50	6	1,93 A
F5	19,50	6	1,93 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)