

Efecto de la adición de polifenoles sobre las características químicas y sensoriales de un
chocolate

Yasmin Quiroga Ruiz
Danilo Alfonso Herrera Sánchez

Trabajo de Grado para Optar el título de ingeniero químico

Director
Luis Javier López Giraldo
Ph.D. Química, Bioquímica y Ciencia de Alimentos

Codirector
Arley René Villamizar Jaimes
Mg. Ciencias y Tecnologías Ambientales

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingeniería Físicoquímica
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2019

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a todas aquellas personas que estuvieron presente para apoyarme durante el desarrollo de él. A mi padre que en paz descanse Alfonso de Jesus Herrera Galvan, y a mi madre Esmith Sanchez Gomez los cuales fueron mis pilares, fuerzas, y motivación.

A Carmen Rosa Tarazona por darme apoyo en aquellos momentos que lo necesité, y a toda la familia Orozco Rueda por su enorme generosidad.

Agradecimientos

A los profesores Luis Javier y Arley René por su dedicación y apoyo para lograr ejecutar y concluir el trabajo de la mejor forma posible.

A la empresa Macoex SAS por contribuir con la materia prima para el desarrollo del estudio.

A la Escuela de Ingeniería Química, la vicerrectoría de investigación y Extensión y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e innovación -Colciencias- por los recursos otorgados a través del proyecto caracterización fisicoquímica, organoléptica y funcional de los materiales de cacao introducidos y materiales de cacao promisorio más comercializados.

Al Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos por su apoyo y colaboración a lo largo de la ejecución de este trabajo.

De igual forma a la Universidad Industrial de Santander por la formación académica.

Tabla de contenido

1. MARCO REFERENCIAL.....	18
1.1 Tendencias de consumo	18
1.2. Chocolate.	18
1.3. Etapas de procesamiento del cacao	18
1.3.1 Etapa poscosecha.....	18
1.3.2. Etapas de manufactura en la empresa MACOEX SAS.	19
1.4. Polifenoles.....	20
1.5 Evolución de los polifenoles en el procesamiento de elaboración de chocolate	22
1.6. Ingesta de polifenoles	23
2. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	23
2.1 Materiales y equipos	23
2.1.1 Reactivos.	23
2.1.2 Equipos.	24
2.2 Metodología de análisis.....	24
2.2.1 preparación de extractos	24
2.2.1.1 Extractos para cuantificación de polifenoles totales, capacidad antioxidante, y capacidad antirradicalaria.....	24
2.2.1.2 Extractos para identificación y cuantificación de Polifenoles (catequina, epicatequina, procianidina y oligómeros).....	24
2.2.2 Cuantificación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.	25

2.2.3. Medición de la capacidad antioxidante por el método ORAC	25
2.2.4. Medición de la capacidad antirradicalaria por DPPH.	26
2.2.5. Identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC.	26
2.2.5.1 Identificación y cuantificación de procianidinas (B1, B2) y demás oligómeros.	26
2.2.5.2 Identificación y cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina	27
2.3 Metodología del análisis estadístico.....	27
2.4 Metodología experimental	28
2.4.1. Fase 0: Recolección y acondicionamiento de la materia prima.	28
2.4.2. Fase 1: Selección de la etapa de adición.	28
2.4.3. Fase 2: Preparación de los materiales de adición y cuantificación de sus polifenoles totales.	28
2.4.4. Fase 3: procedimiento de adición.....	29
4.4.4.1 Implementación de un balance de masa como modelo de adición.	29
2.4.4.2 Caracterización de las propiedades químicas para cada una de las adiciones.	31
2.4.5. Fase 4: determinación del perfil sensorial (sabor) mediante un análisis descriptivo cuantitativo (QDA).	31
3. RESULTADOS	34
3.1 Fase 1: Etapa de adición seleccionada para la adición de material polifenólico durante el proceso de manufactura del chocolate	34

3.2 Fase 2: Polifenoles totales en los materiales de adición determinados por el método Folin-Ciocalteu.....	36
3.3 Fase 3: Confiabilidad del balance de masa como modelo de adición para materiales polifenólicos	37
3.4 Fase 4: cuantificación de propiedades funcionales para un chocolate adicionado con los materiales evaluados	38
3.4.1 Polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.....	38
3.4.2 Capacidad antioxidante por el método ORAC.	40
3.4.3 Capacidad antirradicalaria por el método DPPH.....	42
3.4.3 Polifenoles identificados y cuantificados por HPLC.	44
3.5 Fase 5: Perfil sensorial de un chocolate adicionado con material polifenólico mediante un análisis descriptivo cuantitativo (QDA).....	46
4. CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS.....	50
APÉNDICES	55

Lista de Tablas

Tabla 1. Modelos de adición para los polifenoles.	30
Tabla 2. Niveles de adición teóricos esperados mediante el balance de masa	30
Tabla 3. Polifenoles totales para los materiales adicionados	36
Tabla 4. Error porcentual absoluto medio ponderado para el balance de masa	37

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del proceso de poscosecha del cacao.	19
Figura 2. Esquema del proceso de manufactura del chocolate en la empresa MACOEX SAS..	20
Figura 3. Estructura de los principales flavonoides presentes en el cacao (a)(-)-epicatequina, (b)(+)-catequina y (c) procianidina B2 (d) procianidina B1 . (Pallares, Estupiñan, Perea, & Lopez, 2016).....	20
Figura 4. Interacción de radicales libres y antioxidantes.	22
Figura 5. Esquema de adición para los materiales polifenólicos.	31
Figura 6. Descripción global de la metodología.....	34
Figura 7. Polifenoles totales en las etapas de procesamiento en MACOEX SAS.	34
Figura 8. Polifenoles totales en las adiciones.....	38
Figura 9. Capacidad antioxidante en las adiciones	40
Figura 10. Capacidad antioxidante (ORAC) vs Polifenoles Totales.	41
Figura 11. Capacidad antirradicalaria en las adiciones.....	42
Figura 12 Capacidad antirradicalaria (DPPH) vs Polifenoles Totales.	43
Figura 13. Proporción en el contenido de flavonoides a medida que se aumenta el material adicionado.....	44
Figura 14. Contenido de flavonoides a medida que se aumenta el material adicionado.....	45
Figura 15. Atributos sensoriales para un chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar (a) Positivos, (b) Negativos.....	46

Figura 16. Atributos sensoriales para un chocolate adicionado con extracto liofilizado (a)	
Positivos, (b) Negativos.....	46

Lista de Apéndices

Apéndice a. curvas de calibración.....	55
Apéndice b. Masa de extracto liofilizado adicionado	56
Apéndice c. Masa de pasta de cacao sin fermentar adicionada	56
Apéndice d. Perfil sensorial para el chocolate sin adición de material poli fenólico.....	56
Apéndice e. Perfil sensorial para un chocolate adicionado con polifenoles	57
Apéndice f. resultados experimentales	58
Apéndice g. análisis estadístico	66
Apéndice h. analisis bromatológico	78

Glosario

APE	Error porcentual absoluto
AUC	Área bajo la curva
CE	Chocolate adicionado con extracto liofilizado
CP	Chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Pircrylhydrazyl
EL	Extracto liofilizado
ET	Equivalente Trolox
gms	Gramo de muestra Seca no Desengrasada
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
MAPE	Error porcentual absoluto medio
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
WMAPE	Error porcentual absoluto medio ponderado
mgEAG/gms	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca
μM ET/gms	Micro molar equivalente trolox por gramo de muestra seca
μmolTrolox/gms	Micro moles de trolox por gramo de muestra seca

Resumen

TÍTULO: EFECTO DE LA ADICIÓN DE POLIFENOLES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y SENSORIALES DE UN CHOCOLATE.

AUTORES: Quiroga Ruiz, Yasmin

Sánchez Herrera, Danilo Alonso**

PALABRAS CLAVES: Cacao, Chocolate, Antioxidantes, Polifenoles, Adición.

DESCRIPCIÓN:

En este trabajo se estudió el efecto que tiene la adición de pasta de cacao sin fermentar y extracto liofilizado rico en polifenoles sobre propiedades químicas y perfil sensorial (sabor) de una barra de chocolate. Se evaluó el contenido de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu, la capacidad antioxidante empleando ORAC, la capacidad antiradicalaria por DPPH. Los resultados asociados con la determinación de propiedades químicas se analizaron usando ANOVA y LSD ($p < 0.05$); los resultados asociados con la evaluación sensorial (sabor) se estudiaron por medio de un análisis descriptivo cuantitativo (QDA).

Se observó que a medida que el contenido de polifenoles aumenta el perfil sensorial se ve afectando de forma negativa, provocando una disminución en sus atributos positivos. Así por ejemplo las percepciones de chocolate pasaron de 5 a 0, nuez de 3 a 0, floral de 1 a 0 y frutal de 4 a 0. Así mismo, se apreció que el incremento de la concentración de polifenoles provocó un aumento en los atributos negativos, de hecho la percepciones sensorial a verde pasaron de 0 a 7, amargo de 2 a 6 y astringente de 0 a 9.

La segunda adición hecha con pasta de cacao sin fermentar obtuvo de manera general la mayor aceptación, presenta buenos atributos sensoriales limitados por un nivel de astringencia igual a 3 y mejores atributos funcionales con respecto al chocolate sin adicionar, incrementando 2 veces el contenido de polifenoles totales (**PT**: 27.952 ± 0.664 [mgEAG/gms]), 1.8 veces la capacidad antioxidante (**CA**: 654.621 ± 43.490 [μ molTrolox/gms]) y 1.7 veces la capacidad antiradicalaria (**CAr**: 138.111 ± 9.238 [μ MET/gms]).

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingeniería Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Director: Luis Javier López Giraldo, Ingeniero Químico, Ph.D. Co-director: Arley Rene Villamizar Jaimes, Químico.

Abstract

TITLE: EFFECT OF THE ADDITION OF POLYPHENOLS ON THE CHEMICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF A CHOCOLATE

AUTHORS: Quiroga Ruiz, Yasmin

Sanchez Herrera, Danilo Alonso **

KEY WORDS: Cocoa, Chocolate, Antioxidants, Polyphenols, Addition.

This work study the effect of the addition of unfermented cocoa paste and lyophilized extract rich in polyphenols on chemical properties and sensory profile (flavor) on a chocolate bar. The total polyphenol content was evaluated using the Folin-Ciocalteu method, antioxidant capacity using ORAC, and anti-radical capacity using DPPH. The results associated with the determination of chemical properties were analyzed by ANOVA and LSD ($p < 0.05$); meanwhile, the results associated with the sensory evaluation (taste) were studied by a quantitative descriptive analysis (QDA).

It was observed as the polyphenol content increases, the sensory profile is affected negatively, causing a decrease in its positive attributes. For example, chocolate perceptions went from 5 to 0, nut from 3 to 0, floral from 1 to 0 and fruit from 4 to 0. Likewise, the increase in the concentration of polyphenols caused an increase in negative attributes. In fact, sensory perceptions like green went from 0 to 7, bitter from 2 to 6 and astringent from 0 to 9.

The second addition made with polyphenolic paste obtained the highest acceptance, presented good sensory attributes limited by a level of astringency equal to 3 and better functional attributes with respect to the chocolate without adding, increasing twice the total polyphenol content (PT: $27,952 \pm 0.664$ [mgEAG / gms]), 1.8 times the antioxidant capacity (CA: 654.621 ± 43.490 [μ molTrolox / gms]) and 1.7 times the anti-radical capacity (CAr: 138.111 ± 9.238 [μ MET / gms]).

*Undergraduate Project

**Facultad de Ingeniería Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Director: Luis Javier López Giraldo, Chemical Engineer, Ph.D. Co-director: Arley Rene Villamizar Jaimes, Chem

Introducción

En la actualidad, la tendencia entre los consumidores es adquirir productos alimenticios que tengan efectos positivos sobre su salud reduciendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, varios tipos de cánceres y enfermedades neurodegenerativas, las cuales están relacionadas con el estrés oxidativo. El chocolate es reconocido por tener las propiedades mencionadas, estos beneficios son atribuidos a los efectos antioxidantes que tienen los polifenoles presentes en el cacao (Toro, 2018), los granos de cacao y sus derivados son reconocidos a nivel mundial como la fuente con mayor contenido de polifenoles, más distribuidos y de mayor aceptación (Perez, Neveu, & Scalbert, 2010). Las propiedades antioxidantes del chocolate se ven afectadas por las etapas poscosecha y de manufactura que causan una disminución considerablemente de los compuestos fenólicos (Pallares Pallares, Estupiñan, Perea Villamil, & Lopez Giraldo, 2016). Publicaciones previas han demostrado que es posible extraer polifenoles de los granos de cacao (Villamizar & Lopez, 2017) los cuales, se han usado para aumentar el contenido polifenólico de productos chocolateros (Delgado, Mandujano, Reategui, & Ordoñez, 2018); (Cienfuegos-Jovellanos Fernandez, 2016). Sin embargo, no se ha evaluado la influencia que puede tener la adición en diferentes proporciones de material polifenólico sobre las propiedades funcionales y la aceptación del producto terminado, en este contexto, trabajando en conjunto con la empresa MACOEX SAS, la propuesta fue implementar un modelo de adición para elaborar una barra de chocolate con un máximo de atributos funcionales similares al grano fermentado y seco, evaluando polifenoles totales, capacidad antioxidante, capacidad antirradicalaria y perfil sensorial (sabor)

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar el efecto de la adición de polifenoles liofilizados y en pasta sobre las propiedades químicas y sensoriales de un chocolate en la empresa MACOEX.

Objetivos específicos:

- a) Establecer la etapa del proceso de manufactura del chocolate en donde se adicionará el material polifenólico.
- b) Implementar un modelo para la adición del material polifenólico que garantice propiedades químicas similares a las del grano fermentado y seco
- c) Evaluar la aceptabilidad del chocolate enriquecido teniendo en cuenta los atributos característicos del sabor.

1. Marco Referencial

1.1 Tendencias de consumo

Los principales usos del cacao en la industria alimenticia es la producción de chocolate, productos de confitería, bebidas aromatizadas, postres, manteca de cacao, entre otros (Delgado, Mandujano, Reategui, & Ordoñez, 2018); actualmente se observa una tendencia a formular alimentos que proveen beneficios en la salud más allá de los que trae consigo el alimento naturalmente (Toro, 2018). Por lo tanto, los alimentos (enteros, enriquecidos o fortificados) ahora han asumido el papel de "alimentos funcionales" (Gul, Singh, & Jabeen, 2016).

1.2. Chocolate.

El chocolate es considerado como nutracéutico por poseer sustancias químicas activas presentes de forma natural asociadas con la prevención de enfermedades y mejora de las funciones fisiológicas del organismo (Ostertag, y otros, 2013). El chocolate se obtiene por un proceso de fabricación a partir de materias de cacao que pueden combinarse con productos lácteos, azúcares, emulsificantes (lecitina), espesantes, edulcorantes y otros aditivos.

1.3. Etapas de procesamiento del cacao

1.3.1 Etapa poscosecha. El proceso de producción de barras de chocolate inicia con las etapas poscosecha (también conocidas como beneficio del cacao, Figura 1). Las primera de ellas es la recolección de mazorcas de cacao, en esta etapa se cortan las mazorcas maduras y se extraen las semillas; la segunda etapa es la fermentación, cuyo objetivo es desarrollar los precursores del aroma y sabor a cacao, reduciendo la acidez y la astringencia; la tercera etapa es el secado, con el cual se busca reducir la humedad del grano de 60% a 7%; la cuarta etapa es la selección, esta

consiste en limpiar el cacao de cuerpos extraños separando los granos buenos de los malos, consiguiendo así un producto homogéneo; y finalmente la quinta etapa es el almacenamiento (generalmente se hace en sacos de yute), en la cual se afirma que la almendra ya está lista para pasar a la industria como materia prima (Ojeda, 2018).



Figura 1. Esquema del proceso de poscosecha del cacao.

1.3.2. Etapas de manufactura en la empresa MACOEX SAS. La elaboración del chocolate a escala industrial inicia con el grano de cacao fermentado y seco tal como lo muestra la figura 2. La transformación inicia con la etapa de tostado y descascarillado, el tostado conduce a la eliminación parcial del ácido acético y el desarrollo de compuestos con estructuras cíclicas y aromáticas (Portillo, y otros, 2009), el descascarillado consiste en retirar la cáscara que cubre al grano; posteriormente se lleva a cabo la segunda etapa: la molienda, este tratamiento consiste en triturar los granos para lograr una masa fina y homogénea denominada licor de cacao; la tercera etapa, el refinado, consiste en moler la torta de chocolate para que las partículas que la constituyen sean más finas; la cuarta etapa es el conchado, en donde se aumenta la temperatura con el fin de dispersar, desecar, eliminar sustancias volátiles y homogenizar la pasta, buscando mejorar la viscosidad y la textura; la quinta etapa de estabilización, consiste en moler la torta de chocolate por un periodo de 3 horas para lograr así un menor tamaño de partícula; la sexta etapa se compone por el atemperado y el moldeado, el atemperado consiste en elevar ($^{\circ}50\text{ C}$) y disminuir la

temperatura (27 °C) del chocolate con el objetivo de estabilizar los cristales de la manteca de cacao; finalizando con el moldeado que consiste en depositar el chocolate en moldes para obtener la forma deseada y ser depositado en una envoltura para su posterior comercialización (Delgado, Mandujano, Reategui, & Ordoñez, 2018).



Figura 2. Esquema del proceso de manufactura del chocolate en la empresa MACOEX SAS.

1.4. Polifenoles

El contenido total de polifenoles en el chocolate cambia según la variedad del grano, origen, condiciones de crecimiento, etc. (Redovnikovic, y otros, 2009); el cacao contiene, en promedio, entre 6-12% en contenido polifenoles en peso seco del grano (Godoy, 2015), estos compuestos se dividen principalmente en tres categorías: las catequinas que corresponden al 37% del total, las antocianinas que aportan un 4% adicional y las de mayor proporción son las proantocianidinas con un 58%.

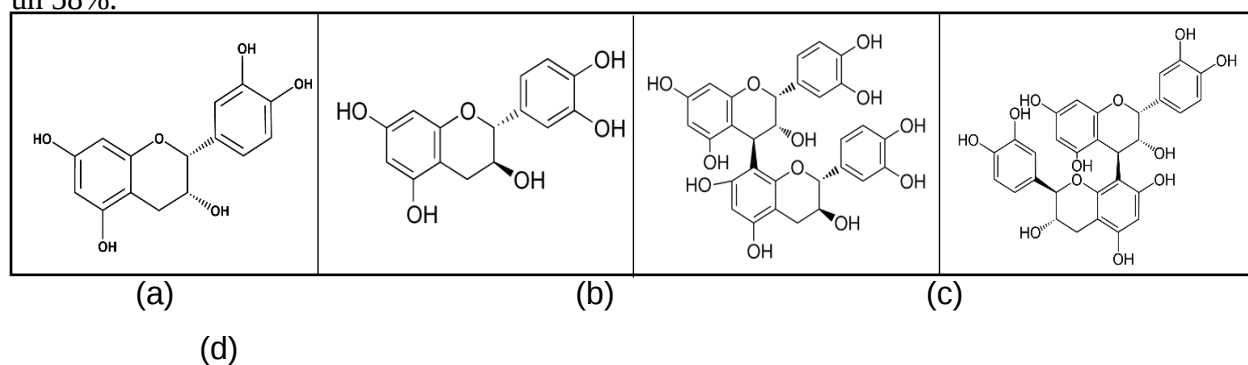


Figura 3. Estructura de los principales flavonoides presentes en el cacao (a)(-)-epicatequina, (b)(+)-catequina y (c) procianidina B2 (d) procianidina B1 . (Pallares, Estupiñan, Perea, & Lopez, 2016)

Los polifenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas, se caracterizan por su capacidad antioxidante, sus anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos que les brindan una estructura especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante, la cual es mediada por mecanismos HAT (transferencia de átomos de hidrogeno), SET (transferencia de un electrón) o antirradicalarios. Estos compuestos han recibido especial atención en la actualidad debido a sus propiedades funcionales como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimutagénicos, antibacteriales y analgésicos que los hacen benéficos para la salud (Toro, 2018).

Como lo muestra la figura 4, un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre (Zaro, 2014). Los polifenoles que se consumen en la dieta, podrían contribuir enormemente a la actividad antioxidante reduciendo los radicales libres peroxil ($\text{ROO}^{\bullet}$), hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$) y superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ejerciendo así una acción positiva en el estado de salud para prevenir el estrés oxidativo celular, los polifenoles han demostrado ser varias veces más eficaces como antioxidantes que las vitaminas E y C, empleadas convencionalmente como antioxidantes naturales (Vásques Ovando, Ovando Medina, Agriano Anaya, Betancour Ancona, & Salvado Figueroa, 2016)

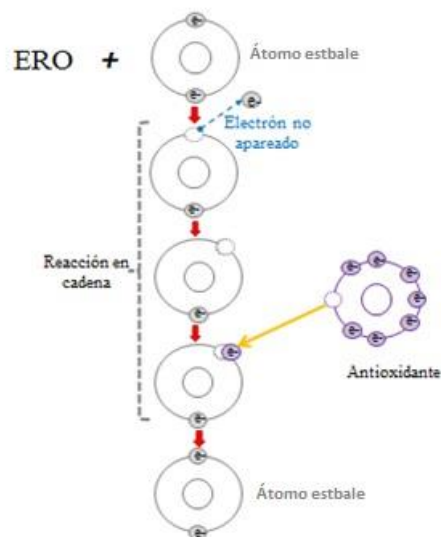


Figura 4. Interacción de radicales libres y antioxidantes.

1.5 Evolución de los polifenoles en el procesamiento de elaboración de chocolate

Durante los procesos poscosecha del cacao se produce una pérdida importante de compuestos fenólicos (Hii, Law, Suzannah, Misnawi, & Cloke, 2009). En efecto, durante el proceso de fermentación se produce la mayor disminución con aproximadamente 38% de polifenoles durante los primeros 4 días, alcanzando una pérdida del 54% de polifenoles pasados los 8 días, (Estupiñan Amaya, 2013) esto atribuido a la acción de la enzima polifenol oxidasa que provoca la formación de los característicos pigmentos pardos (Portillo D. , 2017).

Adicionalmente, durante las etapas de manufactura de chocolate (tostado, refinado, conchado y atemperado) se continúa con un proceso de disminución en el contenido de polifenoles presentes en la semilla y en consecuencia se reduce la capacidad de los productos chocolateros a actuar como

antioxidantes y tener un efecto benéfico sobre la salud (Cadena & Herrera, 2008), (Delgado, Mandujano, Reategui, & Ordoñez, 2018).

1.6. Ingesta de polifenoles

Se han obtenido diversos datos de ingesta de estos agentes bioactivos que varían en función de gustos y hábitos de alimentación; por ejemplo, se han reportado valores de ingesta de 1365.1 mgpolifenoles/día en españoles (Navarro, Periago, & Garcia, 2017), 1193 mgpolifenoles/día en franceses (Pèrez, y otros, 2011), 663.7 mgpolifenoles/día en los sicilianos (Godos, Marventano, Mistretta, Galvano, & Grosso, 2017). Aunque la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes es claramente beneficiosa para la salud, no se ha definido una Ingesta Dietética de Referencia (DRI) para los polifenoles ya que se carece de datos suficientes y fiables sobre su contenido en alimentos y posibles efectos secundarios (Godos, Marventano, Mistretta, Galvano, & Grosso, 2017). Sin embargo, los valores promedios de ingesta mencionados con anterioridad establecen un punto de partida para no alterar de forma drástica la ingesta de compuestos bioactivos presentes en la dieta.

2. Materiales y metodología

2.1 Materiales y equipos

2.1.1 Reactivos. Los reactivos y disolventes empleados en este trabajo fueron grado analítico. A continuación, se mencionan cada uno de ellos: etanol, carbonato de sodio, reactivo de fenol-

Folin-Ciocalteu, ácido gálico, ácido cítrico, buffer de fosfato, trolox, fluoresceína, acetona, AAPH, DPPH.

2.1.2 Equipos. Balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo), espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Spectronic), centrifuga Megafuge16R (Thermo Scientific), Espectrofluorímetro Ascent™ (Thermo Scientific), rotoevaporador Heidolph, baño ultrasónico (ELMASONIC E), bomba de vacío, vórtex, equipo de extracción con control de T, pH, Agitación Bioflow 110 (New Brunswick Scientific), molino de cuchillas (RETSCH), tamiz (WS-Tyler), estufa (WTC), Cromatógrafo líquido acoplado a detector UV-Vis, Molino de piedras CocoaT Melanger ECGC-12SLTA, Descascarillador CocoaT basic Winnower.

2.2 Metodología de análisis

2.2.1 preparación de extractos

2.2.1.1 Extractos para cuantificación de polifenoles totales, capacidad antioxidante, y capacidad antirradicalaria. Se empleó el método descrito por Toro (2018) en el cual se pesó 1 g de muestra en un balón de fondo plano, y se realizaron tres extracciones sucesivas con 20 mL de etanol/agua 80:20 v/v a temperatura de 60 °C, durante 15 min y agitación constante. Los tres medios de extracción fueron centrifugados, filtrados y combinados con el fin de obtener un sobrenadante libre de sólidos suspendidos. Este proceso se realizó por triplicado para cada muestra.

2.2.1.2 Extractos para identificación y cuantificación de Polifenoles (catequina, epicatequina, procianidina y oligómeros).

Se empleó la metodología descrita por Portillo (2017), en la cual se pesaron 0.02 g de muestra en un tubo de ensayo, se agregaron 5 mL de una solución de ácido acético 0.3%:metanol (85:15),

se pusieron en un ultrasonido por 10 min (60°C), se realizó agitación en un vórtex durante 15 min (1500 rpm), se tomó 1 mL de la dispersión con una jeringa y se filtró con filtros PDVF de 0.45 μm , finalmente se depositó en un vial de color ámbar para su posterior análisis por HPLC. Este proceso se realizó por triplicado para cada muestra.

2.2.2 Cuantificación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. Se empleó el método descrito por Trelles (2018): se mezclaron 50 μL del extracto junto con 1.5 mL de solución Folin-Ciocalteu: agua (10:100) se agitaron en un vórtex durante 15 segundos (1500rpm) y se dejó en reposo durante 5 min protegido de la luz, pasado este tiempo se agregaron 1.5 mL de solución de carbonato de sodio: agua (7.5:100 p/v), se realizó agitación en un vórtex durante 15 segundos (1500rpm), se deja en reposo durante 60 min protegido de la luz. Finalmente se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Spectronic), y se calculó la concentración usando la curva de calibración de ácido gálico. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mgEAG/gms).

2.2.3. Medición de la capacidad antioxidante por el método ORAC. Se empleó el método descrito por Godoy (2015). En una microplaca oscura de 96 celdas (12x8); se agregaron 150 μL de una solución de fluoresceína (8×10^{-5} mM) en cada celda, posteriormente se agregaron 25 μL de la muestra, Trolox (6.25 – 50 μM) o solución bufer fostato; según se tratara de muestra a analizar, estándar o blanco, respectivamente. Seguidamente, se introdujo la microplaca en un Espectrofluorímetro AscentTM (Thermo Scientific) y se puso a incubar durante 10 min (37°C). Posteriormente se agregaron 25 μL de AAPH en cada uno de los pozos e inmediatamente se reinsertó en el lector durante 1 hora. La capacidad antioxidante fue calculada a partir de la

diferencia entre el área bajo la curva (AUC) de la fluoresceína de cada muestra menos el AUC del blanco. Los resultados son expresados en micro-mol de trolox por gramo de muestra seca ($\mu\text{mol Trolox/gms}$).

2.2.4. Medición de la capacidad antirradicalaria por DPPH. Se empleó el método descrito por Delgado, Mandujano, Reategui & Ordoñez (2018). Se mezclaron 100 μL del extracto con 3.9 mL de una solución metanólica de DPPH (60 μM) en un tubo de ensayo, se dejó en reposo durante 30 min, posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Spectronic). La capacidad antirradicalaria se calculó con la curva de calibración Trolox. Los resultados son expresados en micro-molar equivalente Trolox por gramo de muestra seca ($\mu\text{MET/gms}$).

2.2.5. Identificación y cuantificación de flavonoides por HPLC.

2.2.5.1 Identificación y cuantificación de procianidinas (B1, B2) y demás oligómeros. La separación cromatográfica se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Toro, Lopez & Decker (2018): en un HPLC ultimate 3300, equipado con un sistema de auto inyección y detector UV-VIS, columna en fase reversa analítica (Zorbax Eclipse XDB 150 mm X 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5 μm , a 40°C. Todos los compuestos se detectaron a una longitud de onda de 204 nm. La fase móvil consistió en agua/ácido fórmico (99.9/0.1 v/v) (solvente A) y acetonitrilo (Solvente B), flujo de 0.2 mL/min. El gradiente fue el siguiente: 0-20 min, 6-10% lineal de B; 20-25 min, 10-13% lineal de B; 25-30 min, 13-15% lineal de B; 30-40 min, 15-10% lineal de B; 40-45 min, 10-6% lineal de B, seguido de 10 min de re-equilibrio de la columna antes de una nueva

inyección con un volumen de inyección de 20 μL . Todos los analitos fueron identificados y cuantificados por el método de estándar externo usando curvas de calibración de las sustancia patrón (catequina).

2.2.5.2 Identificación y cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina. La separación cromatográfica se desarrolló siguiendo la metodología desarrollada en el grupo de investigación CICTA en un HPLC ultimate 3300, equipado con un sistema de auto inyección y detector UV-VIS, columna en fase reversa analítica (Zorbax Eclipse XDB 150 mm X 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5 μm , a 25°C. Todos los compuestos se detectaron a una longitud de onda de 273 nm. La fase móvil consistió en agua/ácido acético (99.7/0.3 v/v) (solvente A) y metanol (Solvente B), flujo de 0.5 mL/min. El gradiente fue el siguiente: 0-10 min, 15% lineal de B; 10,1-18 min, 25% lineal de B; 18,1-25 min, 30% lineal de B; 25,1-30 min, 100% lineal de B; 30,1-35 min, 0 % lineal de B, seguido de 5 min de re-equilibrio de la columna antes de una nueva inyección con un volumen de inyección de 5 μL . Todos los analitos fueron identificados y cuantificados por el método de estándar externo usando curvas de calibración de las sustancias patrón (catequina, epicatequina).

2.3 Metodología del análisis estadístico

Se realizaron pruebas ANOVA ($p < 0.05$) para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras; las diferencias específicas fueron identificadas usando prueba LSD ($p < 0.05$). Los resultados fueron analizados con el software estadístico STATISTICA licencia adscrita al grupo de investigación CICTA. Los descriptores estadísticos (media y desviación estándar) fueron implementados para las representaciones gráficas.

2.4 Metodología experimental

2.4.1. Fase 0: Recolección y acondicionamiento de la materia prima. Las muestras han sido proporcionadas por la empresa MACOEX SAS. Entre ellas se incluyen muestras de la etapa de tostado, molienda, refinado, conchado, estabilización, atemperado, semillas sin fermentar del clon CCN51 y materia prima. Estas muestras fueron almacenadas a 4°C evitando el contacto con la luz hasta su uso.

2.4.2. Fase 1: Selección de la etapa de adición. Se determinó teniendo en cuenta los criterios: (1) pérdida mínima de polifenoles y (2) homogeneización. Para ambos casos se realizó un seguimiento del proceso de manufactura, se monitoreo tomando 10 g de muestra al finalizar cada una de las etapas de procesamiento y se cuantificaron los polifenoles totales empleando el método Folin-Ciocalteu.

2.4.3. Fase 2: Preparación de los materiales de adición y cuantificación de sus polifenoles totales. Los materiales de adición se elaboraron a partir de cacao CCN-51 sometido a inactivación térmica de la enzima polifenol oxidasa, siguiendo el procedimiento descrito por Godoy (Godoy, 2015); el tratamiento se llevó a cabo en un baño de agua caliente (90°C, 5 min) manteniendo una relación de 1:4 m/v grano (con cascarilla). Inmediatamente después del escaldado las muestras se sumergieron en un baño de agua fría (4°C por 30min). Los granos fueron secados en un horno por 72 horas a 60°C.

(1) pasta de cacao sin fermentar. Los granos secos fueron descascarillados, pre-molidos y refinados en un molino de piedras por 2 horas, hasta obtener un tamaño de partícula de 35 μm .

(2) extracto liofilizado. Los granos secos fueron descascarillarlos, triturados en frío (-20°C) y tamizados a través de una malla N°40 (serie Tylor), posteriormente se realizó un proceso de extracción tomando 10 g del grano tamizado que se introdujeron en un 1L de solución etanol:agua (50/50 v/v) a una relación 1/100 p/v soluto:solvente, se realizó un baño ultrasónico a 4°C durante 15 min, posteriormente se calentó a 70 °C con agitación (pH:6) durante 30 min, finalmente se somete a un proceso de centrifugación, se retira el sobrenadante y se liofiliza durante 36 horas, obteniéndose el extracto polifenólico en polvo.

Para ambos casos se midió el contenido de total de polifenoles por la metodología Folin-Ciocalteu.

2.4.4. Fase 3: procedimiento de adición

4.4.4.1 Implementación de un balance de masa como modelo de adición. Se usó un modelo de adición mediante un balance de masa (tabla 1), con el cual se calculó la cantidad de material polifenólico que se debe adicionar para obtener un aumento gradual de 4.3 [mgEA/gms] con cada adición (Apéndices B y C), hasta llegar a la concentración de la materia prima (34-35 [mgEA/gms]), con este fin se establecieron 5 concentraciones de adición a las cuales se pretendió llegar (tabla 2). Para todos los casos se partió de una masa de chocolate sin adicionar de 200 g. El esquema de adición se presenta en la figura 5.

Tabla 1. Modelos de adición para los polifenoles.

Ecuación	Modelo
(1) $m_p = m_b + m_{mp}$	Balance general
(2) $m_p * X_p = m_b * X_b + m_{mp} * X_{mp}$	Balance para polifenoles
(3) $m_p = m_b * (X_b - X_{mp}) / (X_p - X_{mp})$	Masa de polifenoles a adicionar

m_p : Masa de la barra de chocolate adicionada, m_b : masa de chocolate, m_{mp} : masa de material polifenólico, X_p : fracción másica de polifenoles en la barra adicionada, X_b : fracción másica de polifenoles en el chocolate, X_{mp} : fracción másica de polifenoles en el material polifenólico.

Tabla 2. Niveles de adición teóricos esperados mediante el balance de masa

Adición	Polifenoles totales teóricos [mg EAG/ gms]
1	17.620
2	21.920
3	26.220
4	30.520
5	34.820

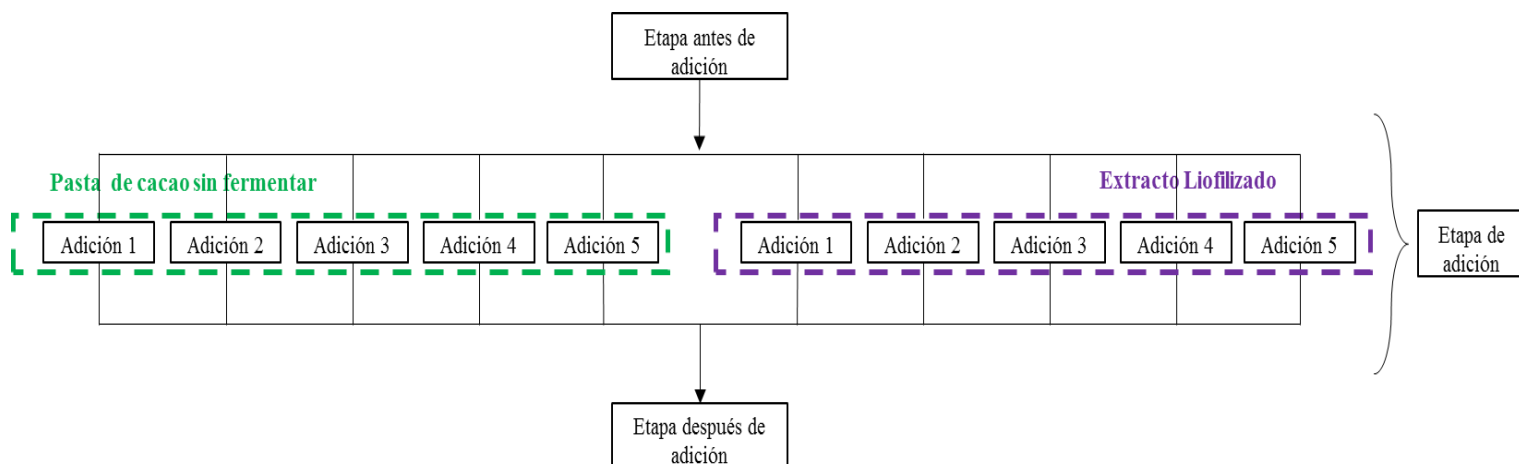


Figura 5. Esquema de adición para los materiales polifenólicos.

Se evaluó la confiabilidad de modelo matemático de adición usando los siguientes criterios estadísticos: error porcentual absoluto (APE), error porcentual absoluto medio (MAPE), error porcentual absoluto medio ponderado (WMAPE) descritos por Galves (Gálvez, 2016).

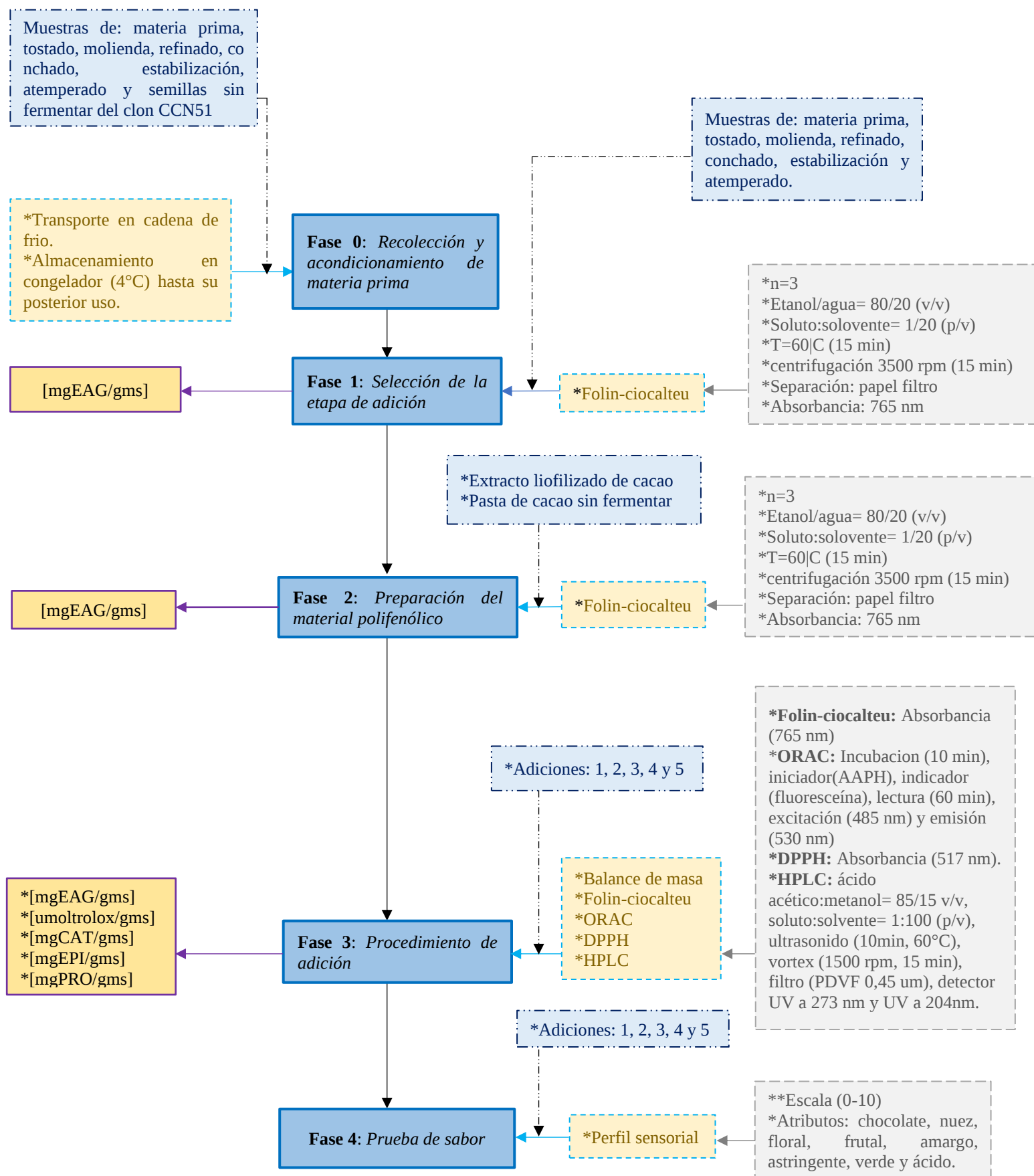
2.4.4.2 Caracterización de las propiedades químicas para cada una de las adiciones. Se realizaron las pruebas Folin-Ciocalteu para medir polifenoles totales, ORAC para medir capacidad antioxidante, DPPH para medir capacidad antirradicalaria y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para identificar y cuantificar (-)-epicatequina, (+)-catequina, procianidinas(B1, B2), y oligómeros.

2.4.5. Fase 4: determinación del perfil sensorial (sabor) mediante un análisis descriptivo cuantitativo (QDA). Un panel de catadores compuesto por cinco personas realizó una prueba descriptiva cualitativa con los siguientes parámetros sensoriales: chocolate, floral, frutal, nuez,

acidez, amargor, astringencia y verde. Para la cuantificación de cada variable se aplicó la escala ordinal 0-10, donde 0 es ausente, 1 a 2 bajo, 3 a 6 medio, 7 a 10 alto.

La sensación que se percibe de cada variable se presenta a continuación: **chocolate:** describe el sabor típico a granos de cacao fermentado, seco y tostado, libre de cualquier contaminación; **floral:** describe una sensación de frescura en la boca; **frutal:** describe sensaciones cercanas al sabor de fruta madura; **nuez:** describe una sensación cercana al sabor de nuez o maní; **acidez:** describe sensaciones que se originan en la presencia de ácidos volátiles y no volátiles; **amargor:** se describe como una sensación fuerte relacionada con los compuestos químicos, específicamente las purinas; **astringencia:** describe una sensación de sequedad en la boca producto de la precipitación de las proteínas de la saliva; **verde:** describe una sensación a sabor manchoso y crudo (Aprotosoaie, Luca, & Miron, 2016).

La evaluación se hizo para todas las adiciones reportándose los valores numéricos.



3. Resultados

3.1 Fase 1: Etapa de adición seleccionada para la adición de material polifenólico durante el proceso de manufactura del chocolate

Figura 6. Descripción global de la metodología

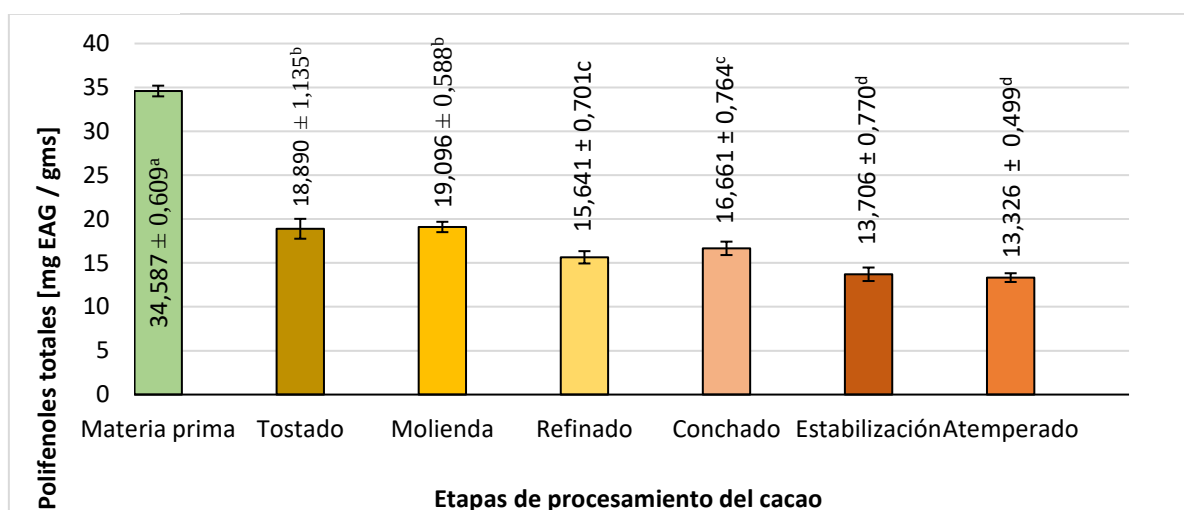


Figura 7. Polifenoles totales en las etapas de procesamiento en MACOEX SAS, gms: gramos por muestra seca. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza $p \leq 0.05$ para una prueba LSD.

En la figura 7 se puede observar una disminución del contenido de polifenoles totales en un 61.47% desde la materia prima hasta la etapa de atemperado, dicha tendencia es similar a los estudios reportados por Cadena y Herrera (Cadena & Herrera, 2008) quienes encontraron una reducción de aproximada de 68.5 % para las mismas etapas mencionadas; también se observa que en la etapa de tostado se evidencia la mayor pérdida de compuestos fenólicos (45.38 %), dicho valor es comparable con el reportado por Galigiani (Galigiani, Cirlini, Palla, Ravaglia, & Arlorio, 2007), donde se concluyó que para semillas de cacao de diferentes variedades, el contenido de

polifenoles totales disminuye en un rango de 32.6% - 54.7% en el proceso de tostado (100°C-130°C) debido al efecto adverso que tiene la temperatura sobre los compuestos fenólicos.

Por otra parte, el contenido de polifenoles aumentó de la etapa de tostado (18.890 [mgEAG/gms]) a la etapa de molienda (19.157 [mgEAG/gms]), en otros estudios se evidenció el mismo comportamiento en el contenido polifenólico entre las etapas de tostado y molienda (29 - 34 [mgEAG/gms]) (Wollgast, 2004), (Cadena & Herrera, 2008), los investigadores atribuyen este comportamiento a la posible aparición de melanoidinas, compuestos formados por las reacciones de Maillard y formación de nuevos compuestos fenólicos resultado de las reacciones de condensación y epimerización, las cuales pueden presentar respuesta positiva al reactivo Folin-Ciocalteu; sin embargo, para el caso bajo estudio la diferencia no fue estadísticamente significativa. A partir de la etapa de estabilización no se encuentran diferencias significativas (ANOVA y LSD, ($p \leq 0.05$)) en el contenido polifenólico, estos resultados son similares a los reportados en otros estudios donde evidencia que no hay cambios sobre el contenido total de polifenoles en la etapa posterior al refinado (Cadena & Herrera, 2008) es por ello que la etapa de estabilización es la seleccionada como la etapa de adición.

3.2 Fase 2: Polifenoles totales en los materiales de adición determinados por el método Folin-Ciocalteu.

Tabla 3. Polifenoles totales para los materiales adicionados

Muestra	Polifenoles Totales[mg EAG/ g*]
Pasta de cacao sin fermentar	68.676 $\pm$ 1.582 ¹
Extracto Liofilizado	446.927 $\pm$ 4.878 ²

* ¹*gms*: gramos muestra seca. ²*glio*: gramos de liofilizado.*

En la tabla 3 se puede observar el contenido de polifenoles de la pasta de cacao sin fermentar (68.676 $\pm$ 1.582 [mgEAG/gms]), dicho valor es comparable con el reportado por Sierra & Peñaranda (Sierra & Peñaranda, 2013) (67.176 [mgEAG/gms]) para cacao sin fermentar; por otro lado el contenido polifenólico para el extracto liofilizado fue 6.5 veces superior al de la pasta de cacao sin fermentar.

3.3 Fase 3: Confiabilidad del balance de masa como modelo de adición para materiales polifenólicos

Tabla 4. Error porcentual absoluto medio ponderado (WMAPE) para el balance de masa

Adición	Polifenoles totales [mg EAG/gms]			APE para CP (%)	APE para CE (%)
	Teórico	CP	CE		
1	17.62	17.309 ± 0.398	16.278 ± 0.418	2.30	8.29
2	21.92	23.880 ± 1.286	21.408 ± 0.386	7.98	2.41
3	26.22	27.952 ± 0.664	23.454 ± 0.641	6.15	11.85
4	30.52	33.908 ± 1.197	31.59 ± 1.043	9.90	3.32
5	34.82	36.829 ± 0.930	34.263 ± 1.259	5.40	3.17
MAPE (%)				6.35	5.81
WMAPE (%)				6.08	

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar, **Teórico:** valores esperados en cada adición usando el balance de masa; **APE:** Error porcentual absoluto; **MAPE:** Error porcentual absoluto medio; **WMAPE:** Error porcentual absoluto medio ponderado.

En la tabla 4 se puede observar un error porcentual absoluto medio (MAPE) de 6.35 % y 5.81 %, para el chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar y extracto liofilizado respectivamente; así mismo, el error porcentual absoluto medio ponderado (WMAPE) fue 6.08 %, lo cual implica que el balance de masa como modelo de adición tiene una confiabilidad de 93.92 % para el determinar el contenido de polifenoles totales en barras de chocolate adicionadas con

pasta de cacao sin fermentar y extracto liofilizado en la empresa MACOEX SAS. Este margen de error puede atribuirse a posibles factores como temperatura y ph los cuales afectan el contenido polifenólico (Cienfuegos-Jovellanos Fernandez, 2016), y no son tenidos en cuenta dentro del balance de masa y adicionalmente a la posible presencia de compuestos reductores (como melanoidinas) los cuales son cuantificables por el método folin-ciocalteu tal como lo mencionan Caderna y Herrera (2008).

3.4 Fase 4: cuantificación de propiedades funcionales para un chocolate adicionado con los materiales evaluados

3.4.1 Polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.

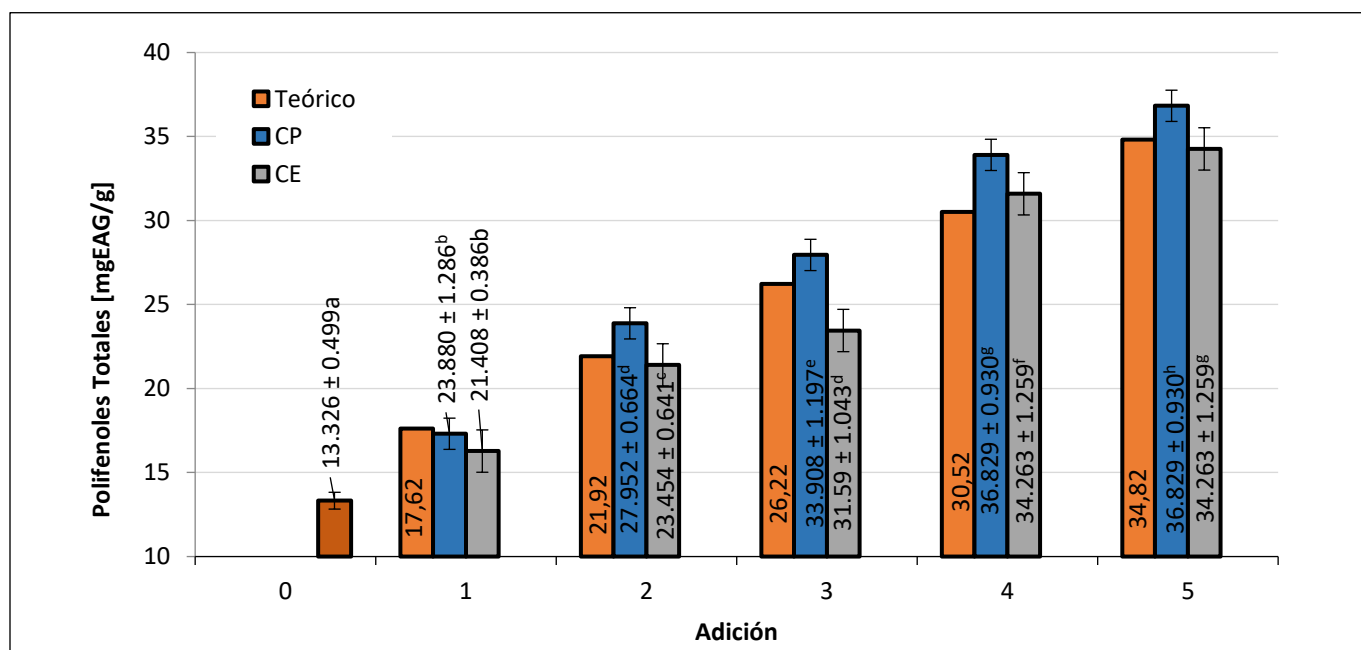


Figura 8. Polifenoles totales en las adiciones; **CE:** barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar, **Teórico:** valores esperados en cada adición por el balance de masa; **Ch:** Chocolate sin adicionar.. gms: gramos por muestra seca. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza $p \leq 0,05$ para una prueba LSD.

En la figura 8 se observa el incremento en el contenido total de polifenoles conforme se aumenta la cantidad de material adicionado (según el procedimiento descrito en la sección 4.4.4). Para el chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar (38% p/p) y extracto liofilizado (4.9% p/p) se logró un aumento máximo en el contenido polifenólico (adición 5) de 2.5 y 2.7 veces respectivamente; estos resultados son mayores a los obtenidos por Delgado (Delgado, Mandujano, Reategui, & Ordoñez, 2018) en donde se logró aumentar el contenido de polifenoles 1.25 veces adicionando un material polifenólico de cacao sin fermentar a una proporción del 7 % p/p. Por otra parte, se puede apreciar que el chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar presenta un contenido de polifenoles mayor al del chocolate adicionado con extracto liofilizado en todos los casos, esto se podría explicar con la posible presencia de otros agentes reductores (melanoidinas) que son cuantificables bajo la metodología Folin-Ciocalteu, tal como lo mencionan Cadena & Herrera (2008).

3.4.2 Capacidad antioxidante por el método ORAC.

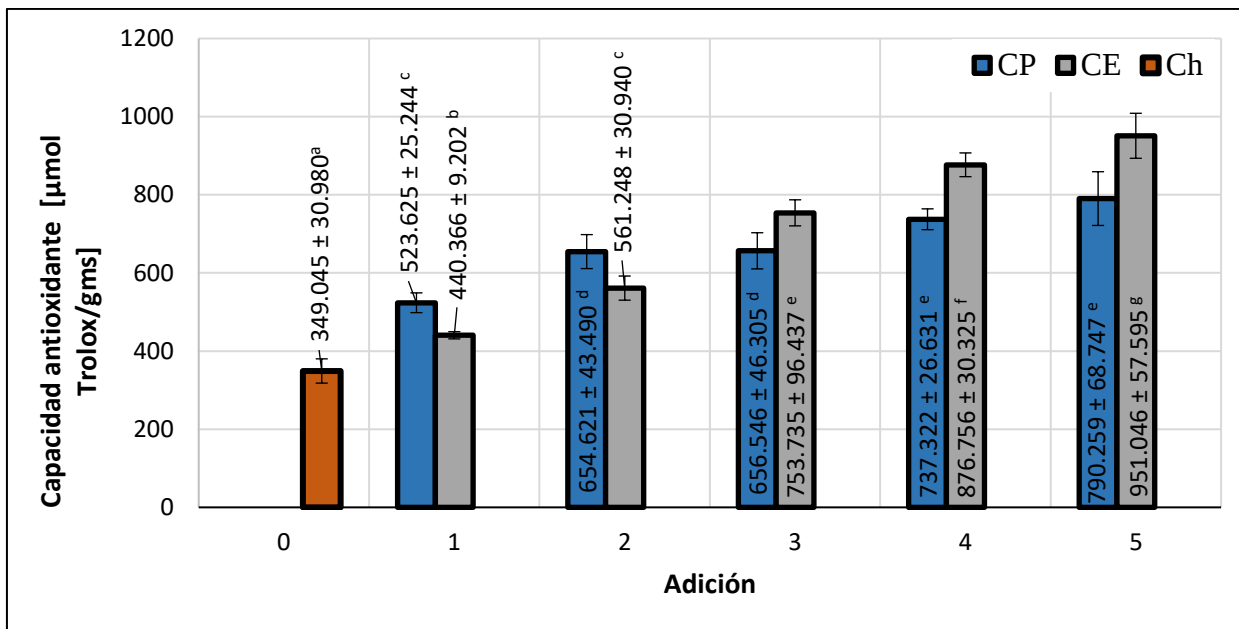


Figura 9. Capacidad antioxidante en las adiciones; **CE:** barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar; **Ch:** Chocolate sin adicionar. gms: gramos por muestra seca. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza $p \leq 0,05$ para una prueba LSD.

En la figura 9 se puede observar un aumento de la capacidad antioxidante desde el chocolate sin adicionar (349.045 ± 30.980 [$\mu\text{molTrolox/gms}$], valores menores a los obtenidos por Cienfuegos-Jovellanos Fernandez 2016, (412 [$\mu\text{molTrolox/gms}$])) hasta un valor máximo (adición 5) de 951.046 ± 57.595 [$\mu\text{molTrolox/g}$] para el chocolate adicionado con extracto liofilizado y de 790.259 ± 68.747 [$\mu\text{molTrolox/g}$] para el chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar, traduciéndose en un aumento de 2.7 y 2.3 veces y respectivamente, siendo este incremento superior al obtenido por Cienfuegos-Jovellanos (Cienfuegos-Jovellanos Fernandez, 2016) en donde se

aumentó la capacidad antioxidante de un chocolate 1.6 veces adicionando una matriz de cacao sin fermentar ligeramente procesada.

También se puede apreciar que la barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado tiene mayor capacidad antioxidante que la adicionada con pasta de cacao sin fermentar a partir de la tercera adición; este cambio podría deberse a que la pasta de cacao sin fermentar tiene un mayor contenido graso (55%) dificultando la cuantificación de la capacidad antioxidante (Del rosario Castro, y otros, 2016)

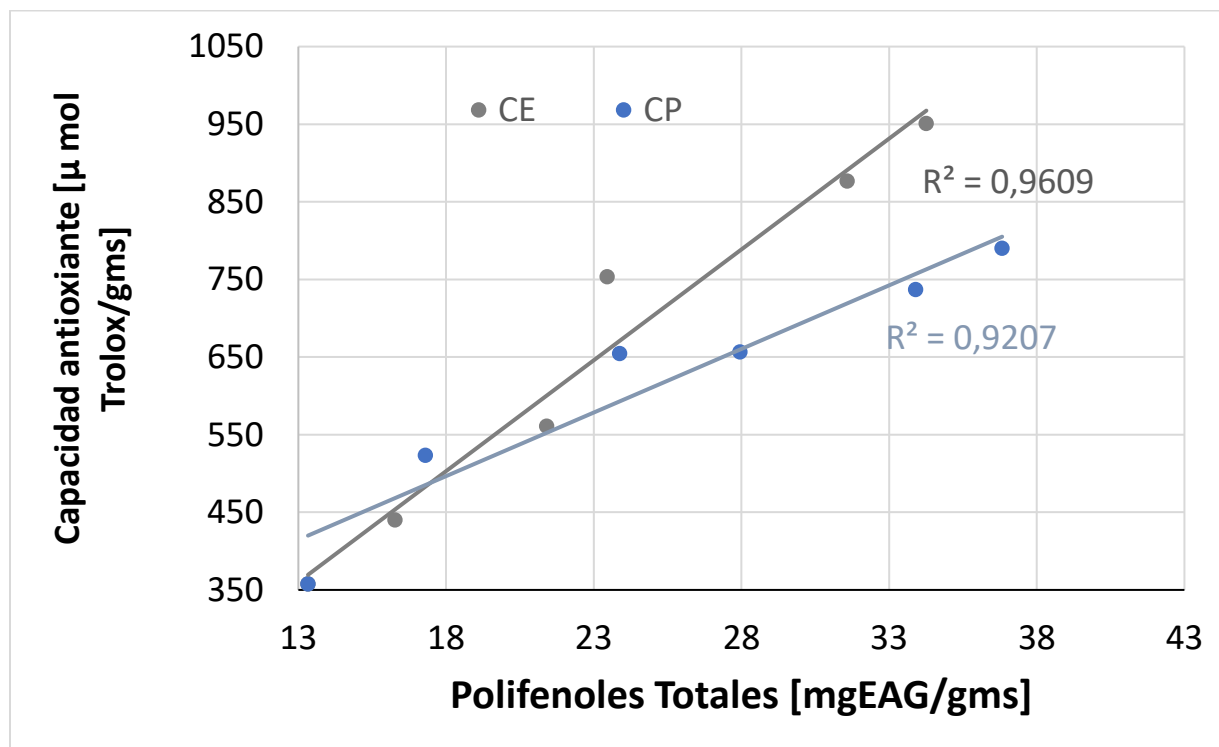


Figura 10. Capacidad antioxidante (ORAC) vs Polifenoles Totales; **CE:** barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar; **Ch:** Chocolate sin adicionar. gms: gramos por muestra seca. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza $p \leq 0,05$ para una prueba LSD.

Al comparar los polifenoles totales sobre la capacidad antioxidante ORAC (figura 10), se encontró que existe una correlación lineal de $R^2=0.921$ y $R^2=0.961$ para el chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar y extracto liofilizado respectivamente; lo cual indica que los polifenoles presentes en las muestras son los responsables de inhibir la disminución de fluoresceína.

3.4.3 Capacidad antirradicalaria por el método DPPH

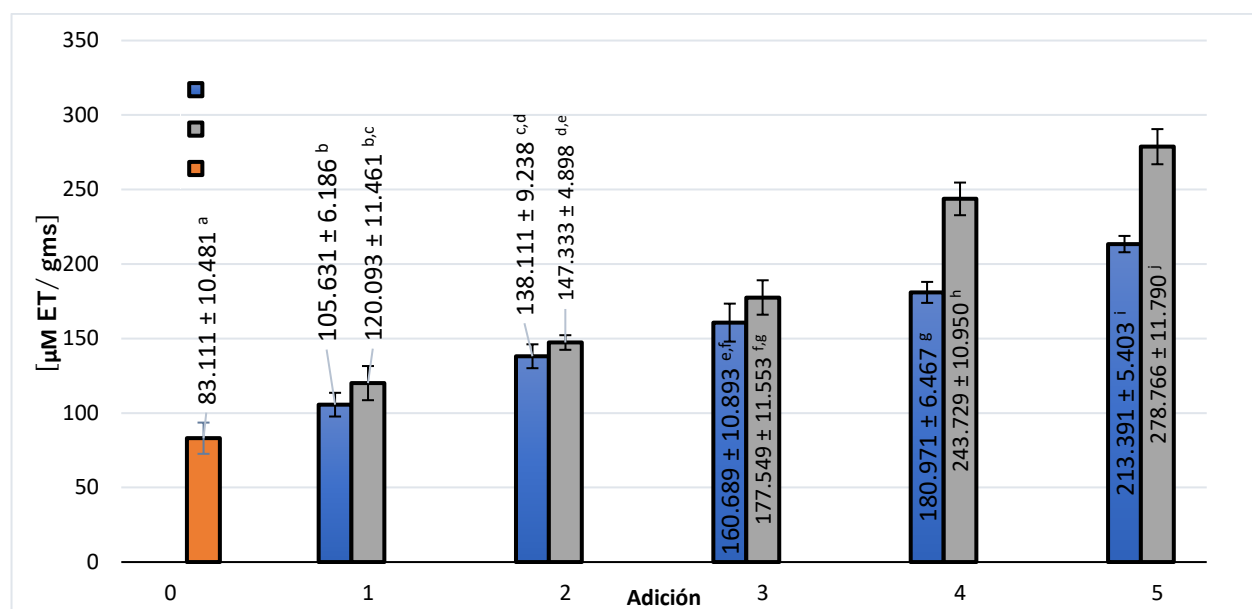


Figura 11. Capacidad antirradicalaria en las adiciones; **CE:** barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar; **Ch:** Chocolate sin adicionar. gms: gramos por muestra seca. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza $p \leq 0,05$ para una prueba LSD.

En la figura 11 se puede observar el aumento de la capacidad antirradicalaria medida por el método DPPH, partiendo de una muestra de chocolate sin adicionar con una capacidad antirradicalaria de 83.11 [μM ET/gms], valor superior al reportado por Todorovic (Todorovic, y

otros, 2015) ($75.1 \text{ } [\mu\text{M ET/gms}]$) para un producto chocolatero. Obteniéndose un valor máximo para la barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado y pasta de cacao sin fermentar de 213.391 ± 5.403 y $278.766 \pm 11.790 \text{ } [\mu\text{M ET/g}]$ respectivamente.

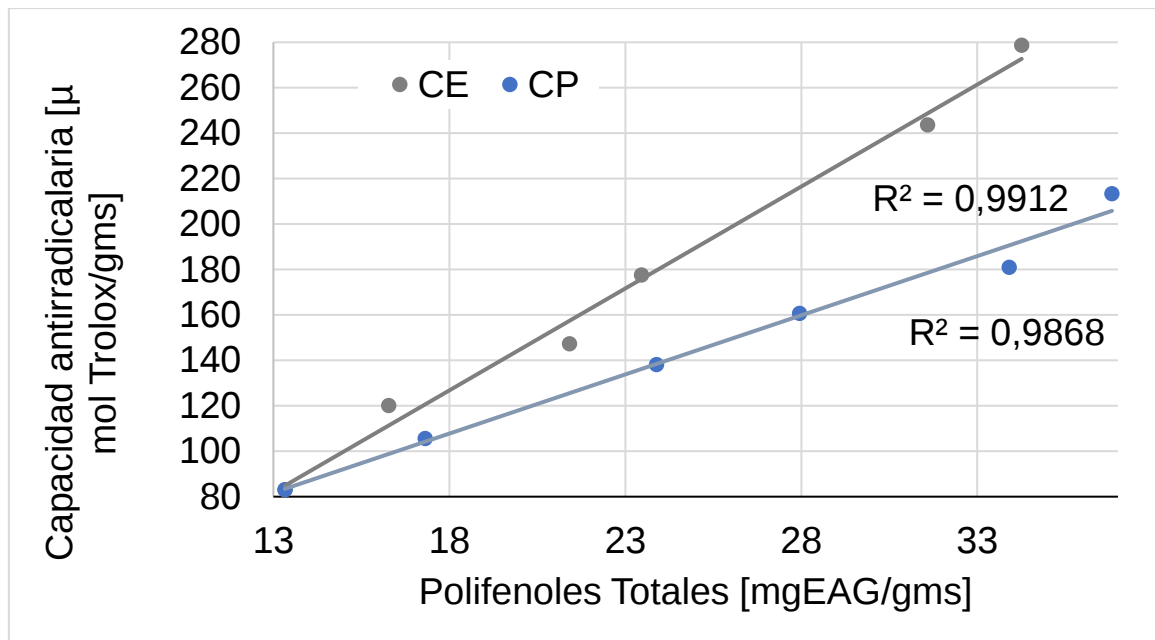


Figura 12 Capacidad antirradicalaria (DPPH) vs Polifenoles Totales, **CE**: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado; **CP**: barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar; **Ch**: Chocolate sin adicionar. gms: gramos por muestra seca.

Relacionando el contenido de polifenoles y la actividad antirradicalaria medida por el método DPPH (figura 12), se encuentra que existe una relación lineal directamente proporcional para el chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar y extracto liofilizado con valores de $R^2=0.987$ y $R^2=0.991$ respectivamente, lo cual indica que los polifenoles presentes en las muestras son los responsables de atrapar el radical libre 1,1-difenil-2- picrilhidrazil (DPPH).

3.4.3 Polifenoles identificados y cuantificados por HPLC.

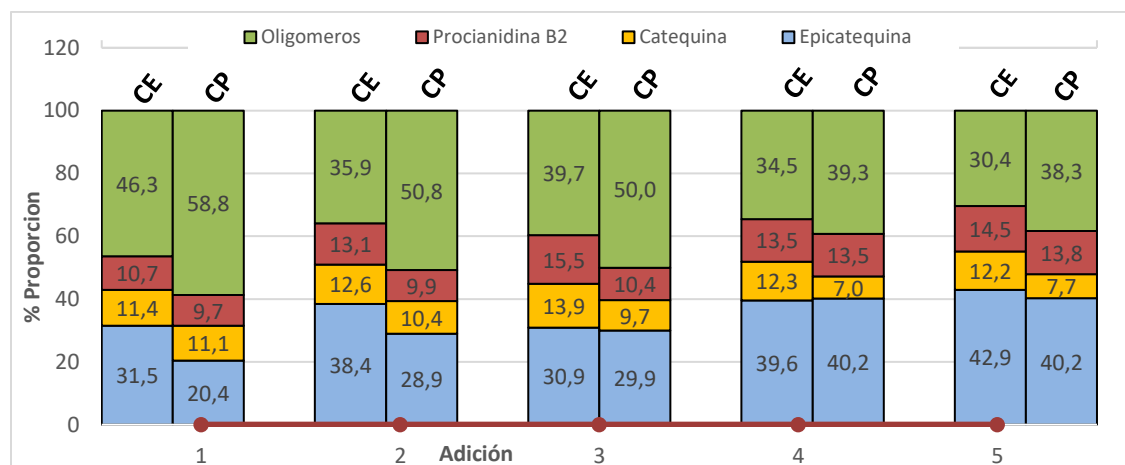


Figura 13. Proporción en el contenido de flavonoides a medida que se aumenta el material adicionado. **CE:** barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar.

De manera general en la figura 13 se puede observar que el contenido de epicatequina y oligómeros se encuentra en mayor proporción para los chocolates adicionados, representando en conjunto una proporción de más del 70% para todos los casos, lo cual sugiere que los materiales de adición son más ricos en epicatequina y oligómeros.

Estudios previos han demostrado que los compuestos fenólicos de elevado peso molecular (roantocianidinas y oligómeros) y compuestos monoméricos (catequina y epicatequina) aumentan la capacidad antioxidante del plasma al ser ingeridos (Nieto Fuentes , 2015); en este contexto los chocolates adicionados con pasta de cacao sin fermentar y extracto liofilizado representando un mayor beneficio para la salud de las personas que los consumen tal como lo menciona Nieto (Nieto Fuentes , 2015).

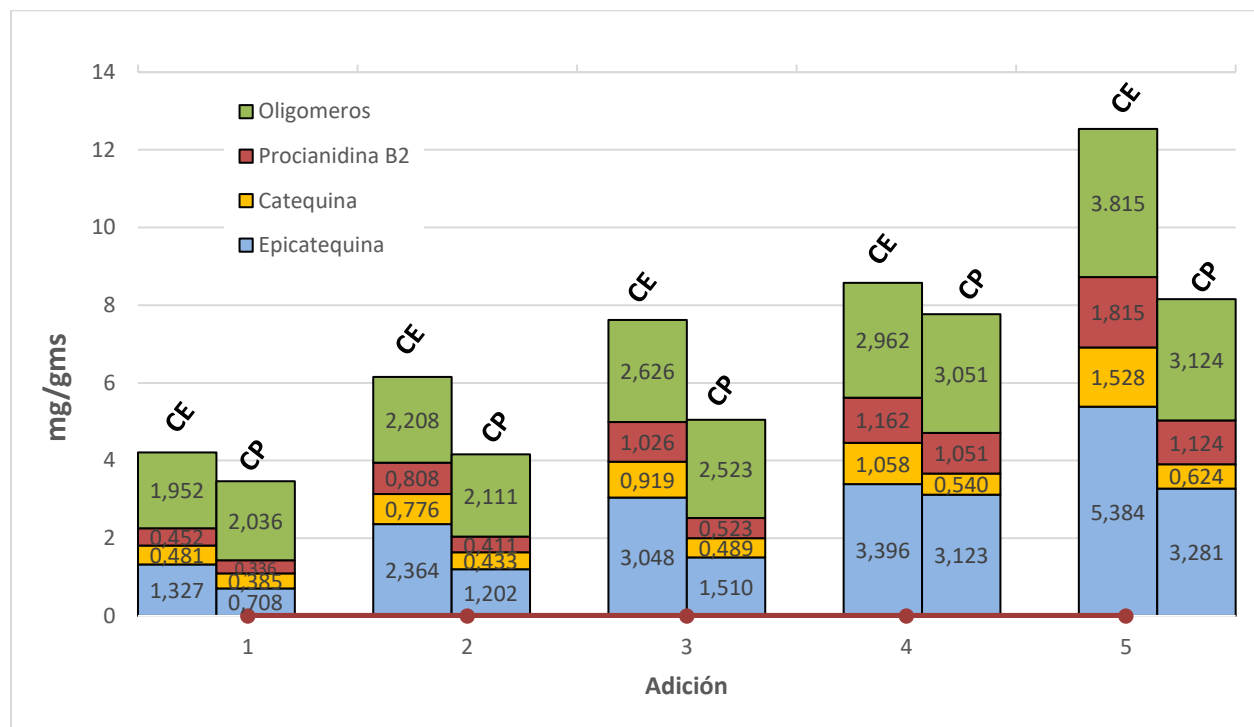


Figura 14. Contenido de flavonoides a medida que se aumenta el material adicionado, concentración expresada mg de polifenol por gramo de muestra seca no desengrasada. **CE:** barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar.

En la figura 14, se puede observar un aumento de catequina, epicatequina, procianidina B2 y demás oligómeros (a excepción de la procianidina B1 que en todos los casos estuvo por debajo del límite cuantificable por el equipo) conforme el material polifenólico es adicionado, esto refuerza la relación directa que hay entre el contenido polifenólico y la capacidad antioxidante.

3.5 Fase 5: Perfil sensorial de un chocolate adicionado con material polifenólico mediante un análisis descriptivo cuantitativo (QDA)

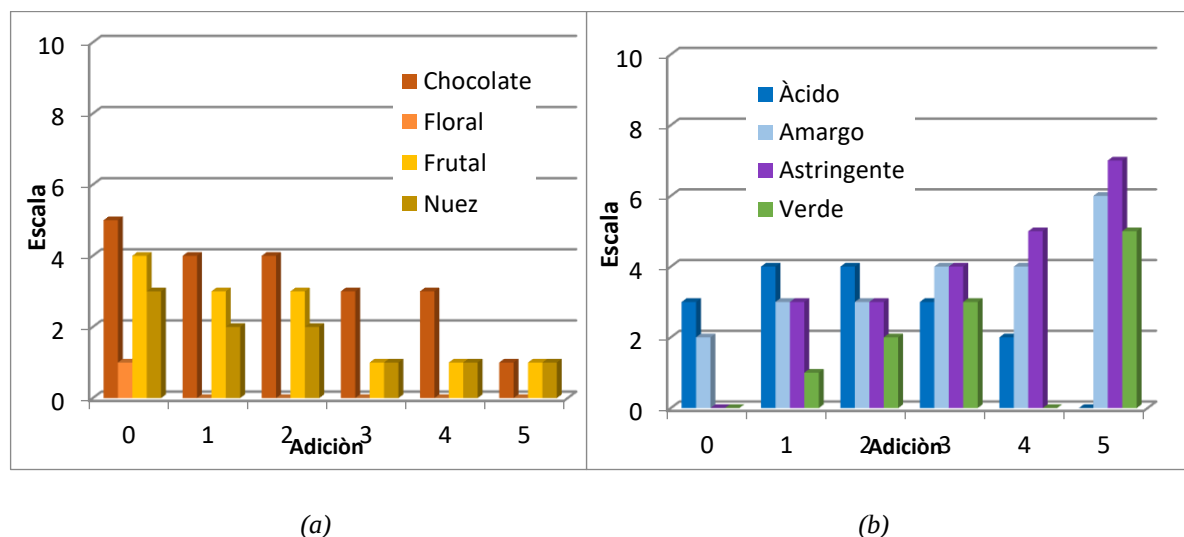


Figura 15. Atributos sensoriales para un chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar (a) Positivos, (b) Negativos

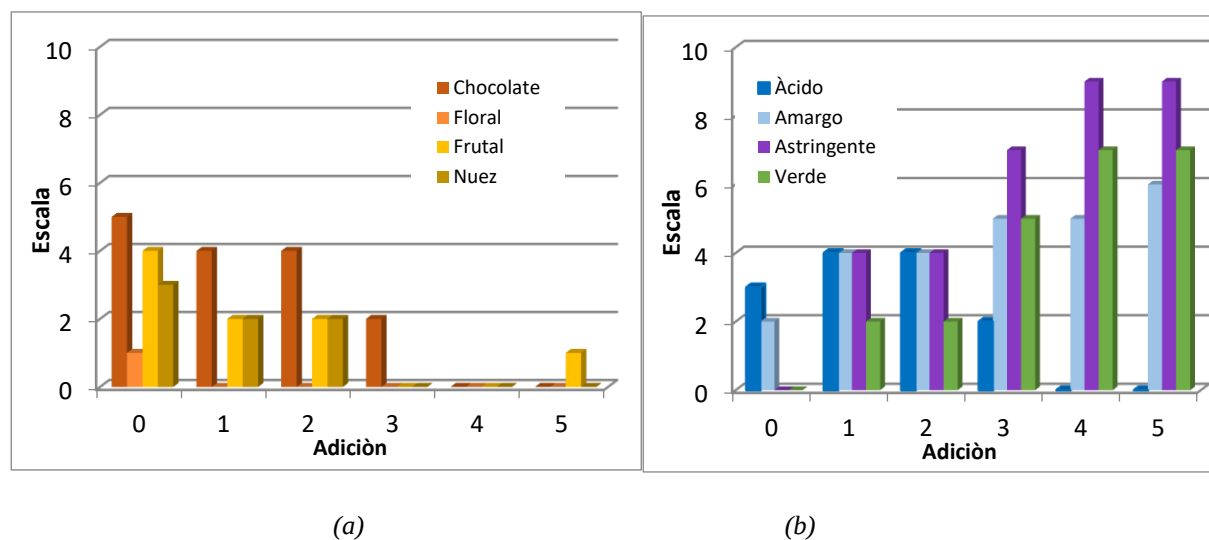


Figura 16. Atributos sensoriales para un chocolate adicionado con extracto liofilizado (a) Positivos, (b) Negativos

De manera general en la figuras 15 y 16 se puede apreciar como el atributo floral desaparece; las características frutal, nuez y chocolate disminuyen su percepción mientras las propiedades verde, amargo y astringente presentan niveles de incremento con la adición de material polifenólico. Esto puede atribuirse a los polifenoles que están positivamente correlacionados con la astringencia y amargura, y negativamente con la característica a floral y frutal (Bordiga, y otros, 2015), (Gonzales, Perez, & Palomino, 2012) y a la ausencia del proceso poscosecha en los materiales polifenólicos de adición, lo cual intensifica la variable verde y evita el desarrollo de sabor a chocolate (Aprotosoiaie, Luca, & Miron, 2016).

Es notable como los atributos sensoriales positivos (chocolate, nuez, floral, y frutos) decrecen con un aumento en el contenido de compuestos bioactivos, estos resultados concuerdan con lo descrito por Delgado (Delgado, Mandujano, Reategui, & Ordoñez, 2018) quien observó un descenso de los atributos sensoriales positivos al adicionar matrices no fermentadas de cacao a un producto chocolatero. Por otra parte, las características sensoriales negativas (verde, amargo y astringente) crecieron de manera proporcional al contenido de polifenoles (a excepción del atributo sensorial ácido el cual cambia de forma inversa).

La segunda adición hecha con pasta de cacao sin fermentar tuvo un balance justo entre atributos sensoriales (chocolate: 4, Acido: 4, amargo:3, Astringente:3, Frutos:3, Nuez:2 y verde:2) limitados por un nivel de astringencia igual a 3 tal como lo señaló el panel experto; no obstante, los atributos funcionales asociados con el contenido de polifenoles totales, la capacidad antioxidante y la capacidad antirradicalaria incrementaron 2 (27.952 ± 0.664 [mgEAG/gms]), 1.8 (654.621 ± 43.490 [$\mu\text{molTrolox/gms}$]) y 1.7 veces (138.111 ± 4.898 [$\mu\text{MET/gms}$]), respectivamente.

4. Conclusiones

El proceso de manufactura del chocolate realizado en la empresa MACOEX SAS tiene un efecto negativo sobre el contenido de polifenoles totales del producto terminado, presentando una pérdida global de 61.47%; siendo la etapa de tostado la que mostró la mayor disminución del contenido de polifenoles totales (45.38 %), y la etapa de estabilización obtuvo la menor pérdida de compuestos fenólicos (16.10%), por lo cual fue seleccionada como la etapa de adición de material polifenólico.

El balance de masa usado como modelo para la adición de material polifenólico presentó un error porcentual absoluto medio (WMAPE) de 6.08 %, con una confiabilidad de 93.92 % para determinar el contenido de polifenoles totales en barras de chocolate adicionadas con pasta de cacao sin fermentar y extracto liofilizado en la empresa MACOEX SAS.

Para la quinta adición se obtuvo un contenido de polifenoles similar al del grano fermentado y seco (13.326 ± 0.499 [mgEAG/gms]) presentando valores de 34.263 ± 1.259 [mgEAG/gms] y 36.839 ± 0.930 [mgEAG/gms] para el chocolate adicionado con extracto liofilizado y pasta de cacao sin fermentar respectivamente; una capacidad antioxidante de 790.259 ± 68.747 [μ molTrolox/gms] y una capacidad antirradicalaria de 213.391 ± 5.403 [μ M ET/gms] para el chocolate adicionado con pasta de cacao sin fermentar; y una capacidad antioxidante de 951.045 ± 57.595 [μ molTrolox/gms] y una capacidad antirradicalaria de 278.766 ± 11.790 [μ M ET/gms] para el chocolate adicionado con extracto liofilizado.

Se observó una correlación negativa entre el contenido de polifenoles y las propiedades sensoriales, presentando una disminución en sus atributos positivos (Chocolate, nuez, floral, frutal) y un aumento en sus atributos negativos (verde, amargo y astringente).

La segunda adición hecha con pasta de cacao sin fermentar obtuvo el balance justo entre propiedades químicas y sensoriales, presentando buenos atributos de sabor (chocolate: 4, Acido: 4, amargo:3, Astringente:3, Frutos:3, Nuez:2 y verde:2) y mejores atributos funcionales con respecto al chocolate sin adicionar; incrementando 2 veces el contenido de polifenoles totales (**PT:** 27.952 ± 0.664 [mgEAG/gms]), 1.8 veces la capacidad antioxidante (**CA:** 654.621 ± 43.490 [μ molTrolox/gms]) y 1.7 veces la capacidad antiradicalaria (**CAr:** 138.111 ± 9.283 [μ MET/gms]).

Referencias bibliogràficas

- Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor chemistry of cocoa and cocoa products-An overview. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 15, 73-91.
- Bordiga, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J., Mazza, G., & Arlorio, M. (2015). Evulation of the effect of processing on cocoa polyphenols: antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate . *International Journal of Food Science and technology* 50, 840-848.
- Cadena, T., & Herrera, Y. (2008). Evaluaciòn del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante. *Universidad industrial de Santander*, 12-14.
- Cienfuegos-Jovellanos Fernandez, E. (2016). *Estudio del Contenido de Compuestos Bioactivos del cacao y su aplicacion en la obtenciòn de un ingrediente rico en (poli)fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido*.
- Del rosario Castro, M., Hernández, J., Marcilla, S., Córdoba, J. S., Solari, F. A., & Chire, G. C. (2016). EFECTO DEL CONTENIDO DE GRASA EN LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE Theobroma cacao L. "CACAO". *Ciencia e Investigación* 2016.

- Delgado, J., Mandujano, J., Reategui, D., & Ordoñez, E. (2018). Desarrollo de chocolate oscuro con nibs de cacao fermentado y no fermentado: polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante y evaluación sensorial. *Scientia Agropecuaria*.
- Estupiñan Amaya, M. R. (2013). *IMPACTO DEL TIEMPO DE FERMENTACION Y SECADO SOBRE LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL CLON DE CACAO CCN-51: ESTUDIO CUANTITATIVO PRELIMINAR*. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Galigiani, A., Cirlini, M., Palla, M., Ravaglia, R., & Arlorio, M. (2007). GC-MS Detection of chiral markers in cocoa Beans of different quality and geographic origin. *Chirality*. 19, 329 -334.
- Gálvez, T. (16 de Agosto de 2016). *Linkedin.com*. Obtenido de <https://www.linkedin.com/pulse/c%C3%B3mo-medir-la-precisi%C3%B3n-de-los-pron%C3%B3sticos-tom%C3%A1s-g%C3%A1lvez/>
- Godos, J., Marventano, S., Mistretta, A., Galvano, F., & Grosso, G. (2017). Dietary sources of polyphenols in the Mediterranean healthy eating, aging and lifestyle (MEAL) study cohort. *Int J food sci nutr.* 68(6), 750-756.
- Godoy, J. (2015). Obtención de antioxidantes a partir de granos de cacao: condiciones favorables de inactivación de la enzima polifenol oxidasa, extracción de polifenoles y ajuste de parámetros cinéticos. *Universidad industrial de Santander*, 21-26.
- Gonzales, M. Y., Perez, S. E., & Palomino, C. C. (2012). Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. *Actualización en nutrición* , 314-331.

- Gul, K., Singh, A., & Jabeen, R. (2016). Nutraceuticals and functional food: the foods for the future world. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2617-2627.
- Hii, C., Law, C., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa (theobroma cacao L). *Asian journal of food and agro-industry*, 702-722.
- Navarro, I., Periago, M., & Garcia, F. (2017). Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos. *Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 21 (4), 320-326.
- Nieto Fuentes, J. A. (2015). *COMPREHENSIVE STUDY OF THE GRAPE (Vitis vinifera L.) AS A SOURCE OF BIOAVAILABLE PHENOLIC COMPOUNDS WITH BIOLOGICAL ACTIVITY*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Ostertag, L., Kroon, P., Wood, S., Horgan, G., Cienfuegos-Jovellanos, E., Saha, S., . . . De Roos, B. (2013). Flavan-3-ol-enriched dark chocolate and white chocolate improve acute measures of platelet function in a gender-specific way-a randomized- controlled human intervention trial. *Molecular nutrition and food research* 57, 191-202.
- Pallares Pallares, A., Estupiñan, M., Perea Villamil, J., & Lopez Giraldo, L. (2016). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *ION*.
- Pallares, A., Estupiñan, M., Perea, J., & Lopez, L. (2016). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*, 29 (2), 7-21.
- Pérez, J., Fezeu, L., Toiver, m., Arnault, N., Manach, C., & Hercberg, S. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr.* 93(6), 1220-1228.

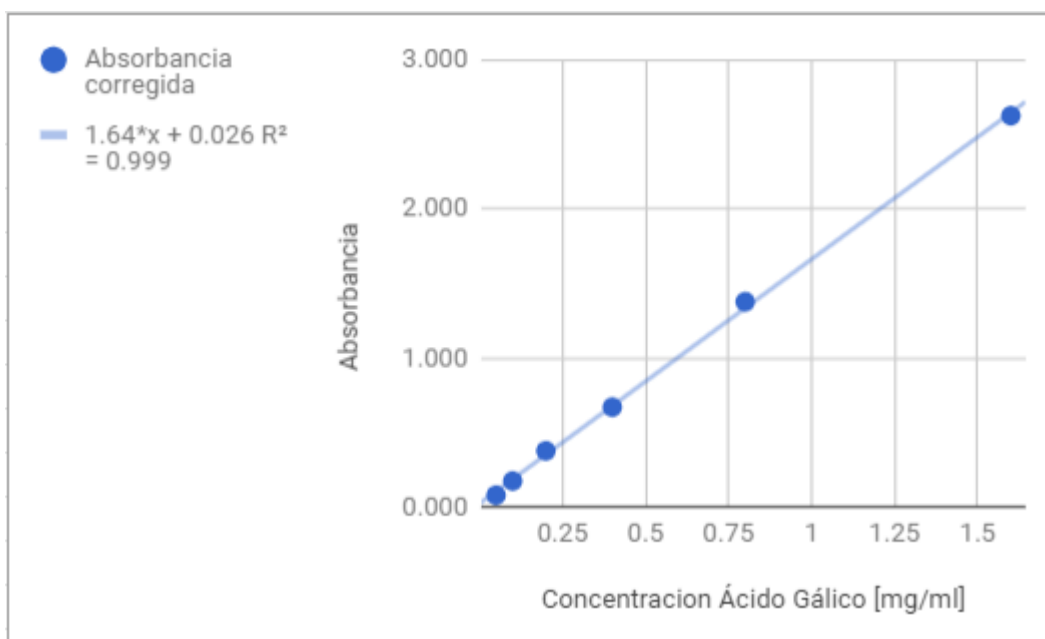
- Perez, J., Neveu, V., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the phenol-explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*. 64, 112-120.
- Portillo, D. (2017). Efecto del procesado en el contenido y perfil de polifenoles de cacao. *Universidad Politècnica de Valencia*.
- Portillo, E., Labarca, M., Grazziani, L., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., & Marcano, M. (2009). Formación del aroma del cacao criollo (*Theobroma cacao* L) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista UDO Agrícola*. 9(2), 458-468.
- Redovnikovic, I., Delonga, K., Mazor, S., Dragovic-Uzelac, V., Caric, M., & Vorkapic-Furac, J. (2009). Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech Journal food science*, 330-337.
- Rosario Castro, M., Hernandez, J., Marcilla, S., Córdona, J., Solari, F., & Chire, G. (2016). EFECTO DEL CONTENIDO DE GRASA EN LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Theobroma cacao* L. "CACAO". *Ciencia e Investigación* 2016.
- Sierra, L., & Peñaranda, J. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante, contenido de polifenoles y metilxantinas en materiales de cacao colombiano. *Universidad Industrial de Santander*, 47-51.
- Todorovic, V., Radojic Redovnikovic, I., Todorovic, Z., Jankovic, G., Dodevska, M., & Sobajic, S. (2015). Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in serbia. *Journal of Food Composition and Analysis*.

- Toro Uribe, S. (2018). *ENCAPSULATION OF ANTIOXIDANTS FROM THEOBROMA CACAO L. FOR FOOD APPLICATIONS: IN VITRO BIOACCESSIBILITY AND KINETIC RELEASE PROFILE*.
- Toro Uribe, S., López Giraldo, L. J., & Decker, E. A. (2018). *Relationship between the Physiochemical Properties of Cocoa Procyanidins and Their Ability to Inhibit Lipid Oxidation in Liposomes*.
- Trelles Noches, C. D. (2018). *"GRASAS, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH Y ABTS) EN CHOCOLATES COMERCIALES"*. Peru: Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Vásques Ovando, A., Ovando Medina, I., Agriano Anaya, L., Betancour Ancona, D., & Salvado Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.
- Villamizar, A., & Lopez, L. (2017). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Universidad Industrial de Santander*.
- Wollgast, J. (2004). The contents and effects of polyphenols in chocolate, qualitative and quantitative analices of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potencial implications of chocolate in human health. *Universidad de Gieben*.
- Zaro, M. J. (2014). *"Análisis de factores que afectan la acumulacion, distribucion y estabilidad de antioxidantes de naturaleza fenólica en berenjena (Solanum melongena L.)"*. Buenos Aires: Universidad Nacional De la Plata.

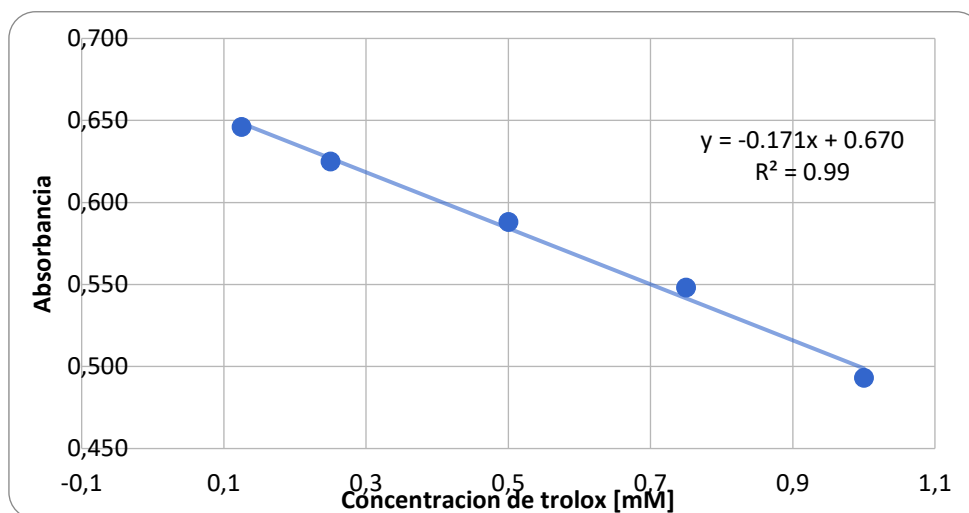
Apéndices

Apéndice A. curvas de calibración

Curva de calibracion de acido galico para pt



CURVA DE CALIBRACION DE TROLOX PARA DPPH



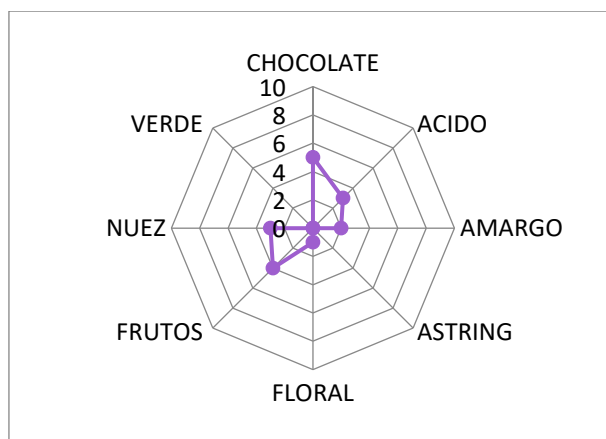
Apéndice B. Masa de extracto liofilizado adicionado

Adición	masa chocolate (g)	extracto liofilizado (g)	% masico adicionado
1	200	2.003	0.992
2	200	4.047	1.983
3	200	6.133	2.975
4	200	8.261	3.967
5	200	10.434	4.958

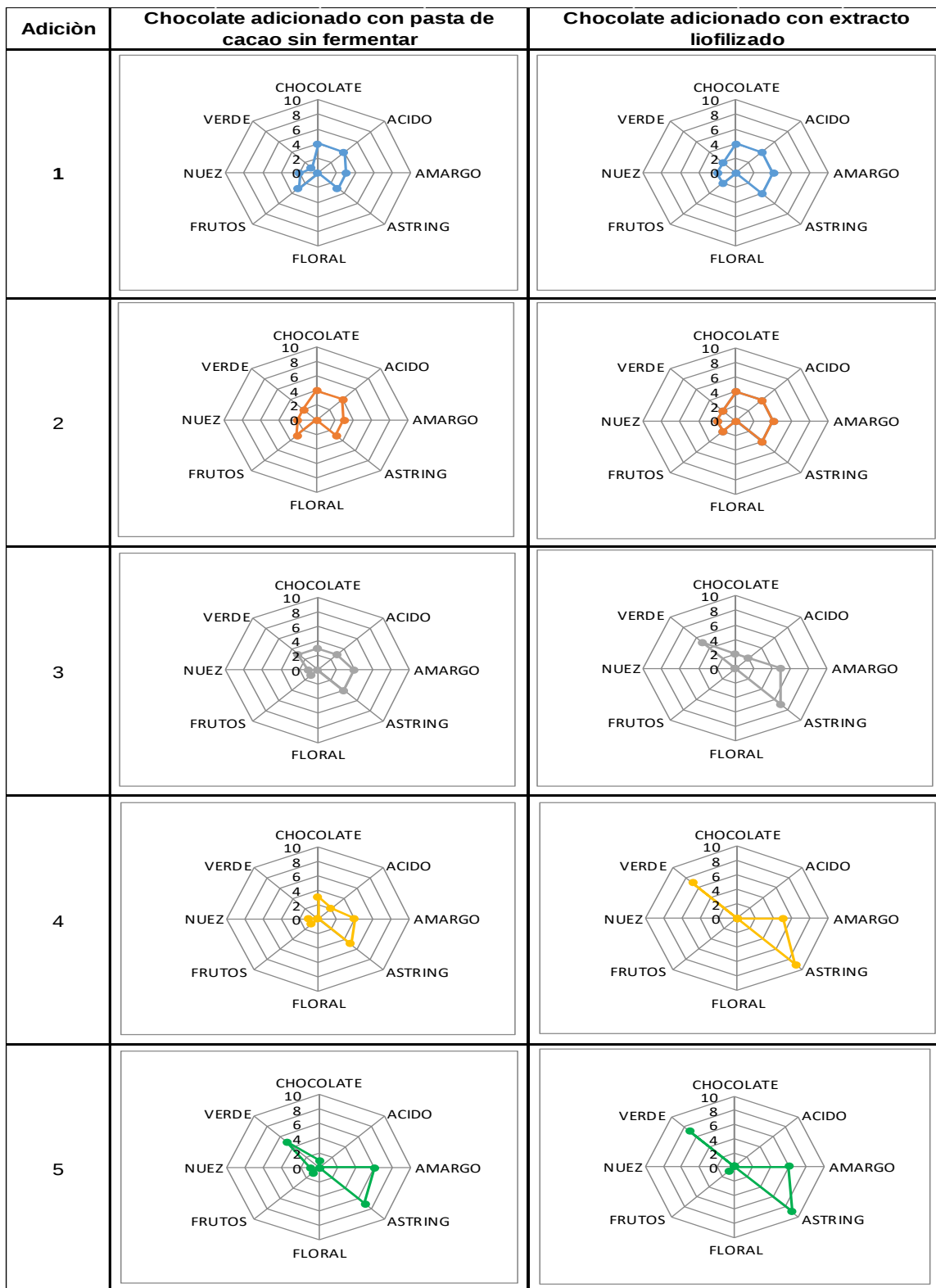
Apéndice C. Masa de pasta de cacao sin fermentar adicionada

Adición	masa chocolate (g)	pasta de cacao sin fermentar (g)	% masico adicionado
1	200	16.848	7.768
2	200	36.787	15.536
3	200	60.769	23.304
4	200	90.156	31.072
5	200	127.009	38.840

Apéndice D. Perfil sensorial para el chocolate sin adición de material poli fenólico



Apéndice E. Perfil sensorial para un chocolate adicionado con polifenoles



Apéndice F. resultados experimentales

a) polifenoles totales durante el proceso de manufactura del chocolate en la empresa macoex

MUESTRA	Polifenoles Totales [mg EAG/ gms*]
Materia prima	34.580
	33.982
	35.200
Tostado	18.988
	19.972
	17.709
Molienda	19.521
	19.342
	18.424
Refinado	16.358
	15.608
	14.957
Conchado	16.755
	15.855
	17.375
Estabilización	12.972
	14.508
	13.637
Atemperado	13.872
	13.211
	12.895

*[mg EAG/ gms]: miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca

Resultados experimentales en las adiciones

b) Polifenoles totales

Resultados expresados en:

[mg EAG/ gms]: **miligramos equivalentes** de ácido gálico por gramo de muestra seca

Tratamiento	ADICIÓN				
	1	2	3	4	5
CP	17.403	25.354	28.955	35.393	37.761
	17.139	25.016	27.150	32.382	35.723
	16.661	24.072	28.463	34.637	37.280
CP (réplica)	17.330	22.110	27.531	34.503	37.471
	17.867	22.620	28.004	33.948	35.595
	17.455	24.109	27.611	32.586	37.143
CE	16.613	21.723	23.243	31.280	34.102
	16.410	20.978	24.175	32.752	35.595
	15.809	21.522	22.945	30.737	33.093

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar.

c) Capacidad antioxidante

Resultados expresados en:

[μmol Trolox/gms]: micro-mol de trolox por gramo de muestra seca.

Tratamiento	ADICIÓN				
	1	2	3	4	5
CP	485.366	684.444	648.675	709.248	729.757
	540.489	631.534	692.000	738.713	721.062
	502.498	634.600	619.578	703.156	907.696
CP (réplica)	552.620	675.965	604.708	742.306	822.170
	535.843	590.819	728.834	766.567	789.905
	524.932	710.364	645.483	763.940	770.966
CEL	447.782	525.729	862.837	857.299	995.121
	443.248	582.335	718.489	861.272	972.141
	430.069	575.679	679.880	911.698	885.878

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar.

d) Capacidad antirradicalaria

Resultados expresados en:

[μ MET/gms]: micro-molar equivalente Trolox por gramo de muestra seca.

Tratamiento	ADICIÓN				
	1	2	3	4	5
CP	98.304	135.288	168.110	183.182	207.298
	104.492	147.158	167.979	186.635	214.946
	114.096	131.888	145.977	173.095	217.929
CP (réplica)	104.685	125.733	147.831	174.469	206.375
	111.731	150.146	170.327	189.055	219.347
	100.478	138.453	163.910	179.390	214.452
CE	106.948	141.972	166.960	232.776	281.860
	125.342	148.452	189.871	243.737	288.700
	127.991	151.574	175.817	254.675	265.738

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; CP: barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar.

e) Cuantificación de (-)-epicatequina.

Resultados expresados en:

[mg/gms]: miligramo por gramo de muestra seca.

Tratamiento	ADICIÓN				
	1	2	3	4	5
CP	1.164	2.940	3.125	3.659	5.399
	1.451	2.122	2.812	3.810	4.670
	1.351	2.321	3.301	3.211	5.439
CP (réplica)	1.001	1.987	3.515	3.269	6.038
	1.217	1.894	2.653	2.665	5.605
	1.776	2.918	2.881	3.763	5.154
CE	0.877	1.023	1.564	2.945	2.714
	0.665	1.248	1.335	3.521	3.713
	0.582	1.334	1.631	2.903	3.417

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar.

f) Cuantificación de (+)-catequina.

Resultados expresados en:

[mg/gms]: miligramo por gramo de muestra seca.

Tratamiento	ADICIÓN				
	1	2	3	4	5
CP	0.442	0.837	0.845	1.143	1.413
	0.452	0.725	1.002	1.061	1.389
	0.502	0.625	0.945	0.985	1.471
CP (réplica)	0.483	0.760	0.879	1.168	1.869
	0.440	0.774	1.002	1.161	1.633
	0.570	0.934	0.843	0.830	1.391
CE	0.460	0.462	0.561	0.469	0.631
	0.371	0.427	0.501	0.575	0.600
	0.324	0.412	0.404	0.575	0.642

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar

g) Cuantificación de procianidina b2.

Resultados expresados en:

[mg/gms]: miligramo por gramo de muestra seca.

Tratamiento	ADICIÓN				
	1	2	3	4	5
CP	0.342	0.361	0.583	0.961	1.113
	0.309	0.413	0.502	1.134	1.199
	0.398	0.424	0.619	1.003	1.071
CP (réplica)	0.342	0.340	0.452	1.006	1.087
	0.312	0.502	0.542	1.186	1.182
	0.313	0.426	0.440	1.016	1.091
CE	0.447	0.779	0.90965	1.154	1.869
	0.497	0.801	1.123	1.161	1.695
	0.412	0.843	1.045	1.171	1.881

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar

h) Cuantificación de oligómeros.

Resultados expresados en:

[mg/gms]: miligramo por gramo de muestra seca.

Tratamiento	ADICIÓN				
	1	2	3	4	5
CP	2.011	2.020	2.472	3.074	3.006
	2.062	2.007	2.352	3.047	3.174
	2.016	2.241	2.491	2.972	3.055
CP (réplica)	2.101	2.144	2.694	3.176	3.301
	2.077	2.099	2.509	2.951	3.129
	1.949	2.155	2.620	3.086	3.079
CE	1.899	2.237	2.564	3.011	3.733
	2.034	2.185	2.716	2.930	3.926
	1.923	2.202	2.598	2.945	3.786

CE: barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado ; **CP:** barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar

Apéndice G. análisis estadístico

Polifenoles totales durante el proceso de manufactura del chocolate en la empresa macoex

a) Análisis de varianza ANOVA ($P < 0.05$)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	959.378	6	159.896	285.43	0
Intra grupos	7.84264	14	0.560189		
Total (Corr.)	967.221	20			

b) Prueba de múltiples rangos LSD ($P < 0.05$)

Etapas	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Atemperado	3	13.3258	a
Estabilización	3	13.7059	a
Refinado	3	15.6411	b
Conchado	3	16.6614	b
Tostado	3	18.8899	c
Molienda	3	19.0958	c
Materia Prima	3	34.5874	d
CONTRASTE		Diferencia	+/- Límites

Materia Prima - Tostado	15.6975	1.31071
Materia Prima - Molienda	15.4916	1.31071
Materia Prima - Refinado	18.9463	1.31071
Materia Prima - Conchado	17.926	1.31071
Materia Prima - Estabilización	20.8815	1.31071
Materia Prima - Atemperado	21.2616	1.31071
Tostado - Molienda	-0.205919	1.31071
Tostado - Refinado	3.24878	1.31071
Tostado - Conchado	2.22846	1.31071
Tostado - Estabilización	5.184	1.31071
Tostado - Atemperado	5.5641	1.31071
Molienda - Refinado	3.4547	1.31071
Molienda - Conchado	2.43438	1.31071
Molienda - Estabilización	5.38992	1.31071
Molienda - Atemperado	5.77002	1.31071
Refinado - Conchado	-1.02032	1.31071
Refinado - Estabilización	1.93522	1.31071
Refinado - Atemperado	2.31532	1.31071
Conchado - Estabilización	2.95554	1.31071
Conchado - Atemperado	3.33564	1.31071
Estabilización - Atemperado	0.380105	1.31071

Polifenoles totales en las adiciones

c) Análisis de varianza ANOVA ($P < 0.05$)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2725.51	10	272.551	335.27	0
Intra grupos	30.0783	37	0.812927		
Total (Corr.)	2755.59	47			

d) Prueba de múltiples rangos LSD ($P < 0.05$)

Abreviatura	Significado	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ch	Chocolate sin adicionar	3	13.3258	a
CE-1	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (1ra adición)	3	16.2773	b
CP-1	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (1ra adición)	6	17.3092	b
CE-2	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (2da adición)	3	21.4077	c
CE-3	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (3ra adición)	3	23.4543	d
CP-2	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (2da adición)	6	23.8802	d
CP-3	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (3ra adición)	6	27.9523	e
CE-4	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (4ta adición)	3	31.5897	f
CP-4	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (4ta adición)	6	33.9082	g
CE-5	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (5ta adición)	3	34.2633	g
CP-5	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar 5ta adición)	6	36.8288	h

CONTRASTE	Diferencia	+/- Límites
CP-1 - CP-2	-6.571	1.05474
CP-1 - CP-3	-10.6432	1.05474
CP-1 - CP.4	-16.599	1.05474
CP-1 - CP-5	-19.5197	1.05474
CP-1 - CE-1	1.03183	1.29179
CP-1 - CE-2	-4.0985	1.29179
CP-1 - CE-3	-6.14517	1.29179
CP-1 - CE-4	-14.2805	1.29179
CP-1 - CE-5	-16.9542	1.29179
CP-1 - Ch	3.9834	1.29179
CP-2 - CP-3	-4.07217	1.05474
CP-2 - CP.4	-10.028	1.05474
CP-2 - CP-5	-12.9487	1.05474
CP-2 - CE-1	7.60283	1.29179
CP-2 - CE-2	2.4725	1.29179
CP-2 - CE-3	0.425833	1.29179
CP-2 - CE-4	-7.7095	1.29179
CP-2 - CE-5	-10.3832	1.29179
CP-2 - Ch	10.5544	1.29179
CP-3 - CP.4	-5.95583	1.05474
CP-3 - CP-5	-8.8765	1.05474
CP-3 - CE-1	11.675	1.29179
CP-3 - CE-2	6.54467	1.29179
CP-3 - CE-3	4.498	1.29179
CP-3 - CE-4	-3.63733	1.29179
CP-3 - CE-5	-6.311	1.29179

CP-3 - Ch	14.6266	1.29179
CP-4 - CP-5	-2.92067	1.05474
CP-4 - CE-1	17.6308	1.29179
CP-4 - CE-2	12.5005	1.29179
CP-4 - CE-3	10.4538	1.29179
CP-4 - CE-4	2.3185	1.29179
CP-4 - CE-5	-0.355167	1.29179
CP-4 - Ch	20.5824	1.29179
CP-5 - CE-1	20.5515	1.29179
CP-5 - CE-2	15.4212	1.29179
CP-5 - CE-3	13.3745	1.29179
CP-5 - CE-4	5.23917	1.29179
CP-5 - CE-5	2.5655	1.29179
CP-5 - Ch	23.5031	1.29179
CE-1 - CE-2	-5.13033	1.49163
CE-1 - CE-3	-7.177	1.49163
CE-1 - CE-4	-15.3123	1.49163
CE-1 - CE-5	-17.986	1.49163
CE-1 - Ch	2.95157	1.49163
CE-2 - CE-3	-2.04667	1.49163
CE-2 - CE-4	-10.182	1.49163
CE-2 - CE-5	-12.8557	1.49163
CE-2 - Ch	8.0819	1.49163
CE-3 - CE-4	-8.13533	1.49163
CE-3 - CE-5	-10.809	1.49163
CE-3 - Ch	10.1286	1.49163
CE-4 - CE-5	-2.67367	1.49163
CE-4 - Ch	18.2639	1.49163
CE-5 - Ch	20.9376	1.49163

Capacidad antioxidante (orac) en las adiciones

a) Análisis de varianza ANOVA ($P < 0.05$)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1133230	10	113323	51.37	0
Intra grupos	81617.8	37	2205.89		
Total (Corr.)	1214850	47			

b) Prueba de múltiples rangos LSD ($P < 0.05$)

Abreviatura	Significado	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ch	Chocolate sin adicionar	3	349.045	a
CE-1	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (1ra adición)	3	440.366	b
CP-1	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (1ra adición)	6	523.625	c
CE-2	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (2da adición)	3	561.248	c
CP-2	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (3ra adición)	6	654.621	d
CP-3	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (2da adición)	6	656.546	d
CP-4	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (3ra adición)	6	737.322	e
CE-3	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (4ta adición)	3	753.735	e
CP-5	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (4ta adición)	6	790.259	e
CE-4	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (5ta adición)	3	876.756	f
CE-5	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar 5ta adición)	3	951.047	g

CONTRASTE	Diferencia	+/- Límites
CP-1 - CP-2	-130.996	54.943
CP-1 - CP-3	-132.922	54.943
CP-1 - CP-4	-213.697	54.943
CP-1 - CP-5	-266.635	54.943

CP-1 - CE-1	83.2583	67.2912
CP-1 - CE-2	-37.623	67.2912
CP-1 - CE-3	-230.111	67.2912
CP-1 - CE-4	-353.132	67.2912
CP-1 - CE-5	-427.422	67.2912
CP-1 - Ch	174.58	67.2912
CP-2 - CP-3	-1.92533	54.943
CP-2 - CP-4	-82.7007	54.943
CP-2 - CP-5	-135.638	54.943
CP-2 - CE-1	214.255	67.2912
CP-2 - CE-2	93.3733	67.2912
CP-2 - CE-3	-99.1143	67.2912
CP-2 - CE-4	-222.135	67.2912
CP-2 - CE-5	-296.426	67.2912
CP-2 - Ch	305.576	67.2912
CP-3 - CP-4	-80.7753	54.943
CP-3 - CP-5	-133.713	54.943
CP-3 - CE-1	216.18	67.2912
CP-3 - CE-2	95.2987	67.2912
CP-3 - CE-3	-97.189	67.2912
CP-3 - CE-4	-220.21	67.2912
CP-3 - CE-5	-294.5	67.2912
CP-3 - Ch	307.501	67.2912
CP-4 - CP-5	-52.9377	54.943
CP-4 - CE-1	296.955	67.2912
CP-4 - CE-2	176.074	67.2912
CP-4 - CE-3	-16.4137	67.2912
CP-4 - CE-4	-139.435	67.2912
CP-4 - CE-5	-213.725	67.2912

CP-4 - Ch	388.277	67.2912
CP-5 - CE-1	349.893	67.2912
CP-5 - CE-2	229.012	67.2912
CP-5 - CE-3	36.524	67.2912
CP-5 - CE-4	-86.497	67.2912
CP-5 - CE-5	-160.787	67.2912
CP-5 - Ch	441.214	67.2912
CE-1 - CE-2	-120.881	77.7012
CE-1 - CE-3	-313.369	77.7012
CE-1 - CE-4	-436.39	77.7012
CE-1 - CE-5	-510.68	77.7012
CE-1 - Ch	91.3213	77.7012
CE-2 - CE-3	-192.488	77.7012
CE-2 - CE-4	-315.509	77.7012
CE-2 - CE-5	-389.799	77.7012
CE-2 - Ch	212.203	77.7012
CE-3 - CE-4	-123.021	77.7012
CE-3 - CE-5	-197.311	77.7012
CE-3 - Ch	404.69	77.7012
CE-4 - CE-5	-74.2903	77.7012
CE-4 - Ch	527.711	77.7012
CE-5 - Ch	602.002	77.7012

Capacidad antirradicalaria (dpph) en las adiciones

a) Análisis de varianza ANOVA ($P < 0.05$)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	126165	10	12616.5	162	0
Intra grupos	2881.47	37	77.8775		
Total (Corr.)	129046	47			

b) Prueba de múltiples rangos LSD ($P < 0.05$)

Abreviatura	Significado	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ch	Chocolate sin adicionar	3	83.1109	a
CP-1	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (1ra adición)	6	105.631	b
CE-1	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (1ra adición)	3	120.094	b,c
CP-2	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (2da adición)	6	138.111	c,d
CE-2	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (3ra adición)	3	147.333	d,e
CP-3	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (2da adición)	6	160.689	e,f
CE-3	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (3ra adición)	3	177.549	f,g
CP-4	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (4ta adición)	6	180.971	g
CP-5	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar (4ta adición)	6	213.391	h
CE-4	barra de chocolate adicionada con extracto liofilizado (5ta adición)	3	243.729	i
CE-5	barra de chocolate adicionada con pasta de cacao sin fermentar 5ta adición)	3	278.766	j

CONTRASTE	Diferencia	+/- Límites
CP-1 - CP-2	-32.48	17.4607
CP-1 - CP-3	-55.058	17.4607
CP-1 - CP-4	-75.34	17.4607
CP-1 - CP-5	-107.76	17.4607
CP-1 - CE-1	-14.4627	21.3849

CP-1 - CE-2	-41.7017	21.3849
CP-1 - CE-3	-71.9183	21.3849
CP-1 - CE-4	-138.098	21.3849
CP-1 - CE-5	-173.135	21.3849
CP-1 - Ch	22.5201	21.3849
CP-2 - CP-3	-22.578	17.4607
CP-2 - CP-4	-42.86	17.4607
CP-2 - CP-5	-75.2802	17.4607
CP-2 - CE-1	18.0173	21.3849
CP-2 - CE-2	-9.22167	21.3849
CP-2 - CE-3	-39.4383	21.3849
CP-2 - CE-4	-105.618	21.3849
CP-2 - CE-5	-140.655	21.3849
CP-2 - Ch	55.0001	21.3849
CP-3 - CP-4	-20.282	17.4607
CP-3 - CP-5	-52.7022	17.4607
CP-3 - CE-1	40.5953	21.3849
CP-3 - CE-2	13.3563	21.3849
CP-3 - CE-3	-16.8603	21.3849
CP-3 - CE-4	-83.0403	21.3849
CP-3 - CE-5	-118.077	21.3849
CP-3 - Ch	77.5781	21.3849
CP-4 - CP-5	-32.4202	17.4607
CP-4 - CE-1	60.8773	21.3849
CP-4 - CE-2	33.6383	21.3849
CP-4 - CE-3	3.42167	21.3849
CP-4 - CE-4	-62.7583	21.3849
CP-4 - CE-5	-97.795	21.3849
CP-4 - Ch	97.8601	21.3849

CP-5 - CE-1	93.2975	21.3849
CP-5 - CE-2	66.0585	21.3849
CP-5 - CE-3	35.8418	21.3849
CP-5 - CE-4	-30.3382	21.3849
CP-5 - CE-5	-65.3748	21.3849
CP-5 - Ch	130.28	21.3849
CE-1 - CE-2	-27.239	24.6931
CE-1 - CE-3	-57.4557	24.6931
CE-1 - CE-4	-123.636	24.6931
CE-1 - CE-5	-158.672	24.6931
CE-1 - Ch	36.9828	24.6931
CE-2 - CE-3	-30.2167	24.6931
CE-2 - CE-4	-96.3967	24.6931
CE-2 - CE-5	-131.433	24.6931
CE-2 - Ch	64.2218	24.6931
CE-3 - CE-4	-66.18	24.6931
CE-3 - CE-5	-101.217	24.6931
CE-3 - Ch	94.4384	24.6931
CE-4 - CE-5	-35.0367	24.6931
CE-4 - Ch	160.618	24.6931
CE-5 - Ch	195.655	24.6931

Apéndice H. análisis bromatológico

Material de adición	% Ceniza	%Humedad	% Proteína	% Grasa
Pasta de cacao sin fermentar	0.03	0.037	13.067	55.251
Extracto liofilizado	4.41	6.1	16.03	20.32