

**IMPACTO DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y SECADO SOBRE LA
CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL
CLON DE CACAO CCN-51: ESTUDIO CUANTITATIVO PRELIMINAR**

MAUREN ROCIO ESTUPIÑÁN AMAYA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

**IMPACTO DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y SECADO SOBRE LA
CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL
CLON DE CACAO CCN-51: ESTUDIO CUANTITATIVO PRELIMINAR**

MAUREN ROCIO ESTUPIÑÁN AMAYA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniera Química**

Director

LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO

Ph.D. Química, Bioquímica y Ciencias de los Alimentos

Co Directora

ANDREA KATHERINE PALLARES PALLARES

Ingeniera Química

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2013

DEDICATORIA

A mis Padres, por toda una vida dedicada a la construcción de una noble obra:

La Familia.

*Junto a ellos he aprendido que el Amor verdadero es el que sienten los padres por sus hijos,
que los auténticos amigos y compañeros de vida son los hermanos,
que en ocasiones tenemos más que aprender de los niños
y que los momentos más felices son a su lado.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen María por tantas bendiciones recibidas.

A la Escuela de Ingeniería Química, la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander 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 regionales de cacao promisorios más comercializados en el país, código 1102-502-27924.

Al CICTA por facilitar las instalaciones, equipos y materiales para la realización de los análisis experimentales. A Fedecacao por suministrar las muestras de cacao y permitir el acceso a sus instalaciones con el fin de realizar las actividades de beneficio necesarias del proyecto.

A toda mi familia por su amor incondicional, y por ser la base fundamental de mi formación. A mi hermana Deissy por su amistad.

Al Profesor Luis Javier López porque además de ser docente ha sido maestro, se ha convertido en ejemplo a seguir por su profesionalismo y calidad humana. Gracias también por la confianza depositada en mí y apoyo en todo momento.

A Andrea Pallares por compartir conmigo sus conocimientos, por su colaboración y compañerismo durante la realización de este proyecto y por brindarme su amistad.

A los compañeros del CICTA por los momentos agradables que compartimos en el tiempo que trabajamos juntos. Y a los funcionarios y colaboradores de Fedecacao en San Vicente de Chucurí, por tantas enseñanzas sobre el cacao y sobre la vida.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	15
1. DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
1.1 REACTIVOS	21
1.2 EQUIPOS DE LABORATORIO	21
1.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	22
1.4 RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA	22
1.5 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	23
1.5.1 Acondicionamiento de la materia prima	24
1.5.2 Preparación de extractos polifenólicos	24
1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS	24
1.6.1 Determinación de polifenoles totales	24
1.6.2 Determinación de la capacidad antioxidante	25
1.7 MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	26
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	27
2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	27

2.2 CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES	28
2.2.1 Modelo matemático de la cinética del contenido de polifenoles totales	31
2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	33
2.3.1 Modelo matemático de la cinética de la capacidad antioxidante	35
2.4 RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	37
3. CONCLUSIONES	39
4. RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXOS	46

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental	22
Tabla 2. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de polifenoles totales	29
Tabla 3. Contenido de polifenoles totales para cada uno de los puntos experimentales	30
Tabla 4. Error relativo porcentual de polifenoles totales reportados por otros autores y polifenoles totales calculados con la ecuación 2, para diferentes materiales de cacao	32
Tabla 5. Análisis de varianza ANOVA para la capacidad antioxidante	33
Tabla 6. Capacidad antioxidante CA calculada por el método ORAC para cada uno de los puntos experimentales	34
Tabla 7. Error relativo porcentual de capacidad antioxidante para cacao colombiano (fuente Gil, 2012) y la capacidad antioxidante calculada con la ecuación 3	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama de efectos principales de la fermentación y el secado sobre el porcentaje de humedad de los granos de cacao	27
Figura 2. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados del contenido de polifenoles totales	28
Figura 3. Diagramas de dispersión para el contenido de polifenoles totales	29
Figura 4. Modelo matemático de la cinética del contenido de polifenoles totales en función del tiempo de fermentación	32
Figura 5. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados de la capacidad antioxidante	33
Figura 6. Diagramas de dispersión para la capacidad antioxidante	34
Figura 7. Modelo matemático de la cinética de la capacidad antioxidante en función del tiempo de fermentación	36
Figura 8. Relación entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante	37

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO A. ESTRUCTURAS BÁSICAS DE LOS POLIFENOLES PRESENTES EN CACAO	47
ANEXO B. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES POR EL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU	49
ANEXO C. CURVA DE CALIBRACIÓN DE TROLOX® PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC	50
ANEXO D. PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro
AG	Ácido Gálico
CA	Capacidad Antioxidante
CICTA	Centro de Investigación y Ciencia en Tecnología de Alimentos
CVD	Enfermedad cardiovascular (<i>Cardiovascular Disease</i>)
EAG	Equivalentes Ácido Gálico
ER	Error Relativo Porcentual
F	Tiempo de fermentación (días)
Fedecacao	Federación Nacional de Cacaoteros
GL	Grados de Libertad
Gms	Gramos de muestra seca
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
Min	Minuto
NFCS	sólidos de cacao libres de grasa (<i>Nonfat Cocoa Solids</i>)
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
PT	Polifenoles Totales
ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Tiempo de secado (días)
S	Segundo
SC	Suma de cuadrados
SD	Desviación estándar
SMC	Suma media de cuadrados
TE	Trolox Equivalente
Trolox®	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

RESUMEN

TÍTULO: IMPACTO DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y SECADO SOBRE LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL CLON DE CACAO CCN-51: ESTUDIO CUANTITATIVO PRELIMINAR*

AUTOR: Mauren Rocío Estupiñán Amaya**.

PALABRAS CLAVE: Fermentación, secado, polifenoles, capacidad antioxidante, cacao, CCN-51.

DESCRIPCIÓN:

La primera fase de la transformación del cacao en chocolate se conoce como beneficio y comprende las etapas de fermentación y secado. Se sabe que estas etapas tienen un impacto directo sobre las cualidades sensoriales y funcionales del grano. No obstante, los estudios realizados no involucran materiales genéticos de amplio cultivo en Colombia como el CCN-51. En consecuencia, en este trabajo se evaluó el efecto que tienen el tiempo de fermentación y de secado sobre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. El trabajo fue desarrollado empleando un diseño de experimentos factorial multinivel (4 niveles de fermentación y 3 de secado). El contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante fueron determinados empleando los métodos de Folin-Ciocalteu y ORAC, respectivamente. El efecto de los factores (fermentación y secado) sobre las variables respuesta seleccionadas se determinó por análisis estadístico. En ambos casos el análisis de los resultados mostró que la fermentación y su efecto cuadrático son las variables que presentan mayor incidencia sobre las variables de respuesta. Además, se encontró que para 2 días de fermentación se alcanzan los mayores valores de concentración de polifenoles totales ($77,70 \pm 0,37$ mgEAG/gms) y capacidad antioxidante ($1007,70 \pm 69,63$ μ molTE/gms); los cuales son comparables con los reportados para otros tipos de cacao. Finalmente, fueron propuestos dos modelos matemáticos que describen la variación de polifenoles totales y de capacidad antioxidante en función de los días de fermentación, con ajustes (R^2) de 0,981 y 0,987 respectivamente.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Director Luis Javier López Giraldo. Co Directora Andrea Katherine Pallares Pallares

ABSTRACT

TITLE: IMPACT OF FERMENTATION AND DRYING TIME ON THE AMOUNT OF TOTAL POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF COCOA CLONE CCN-51: PRELIMINARY QUANTITATIVE STUDY*

AUTHOR: Mauren Rocío Estupiñán Amaya **

KEYWORDS: Fermentation, drying, polyphenols, antioxidant capacity, cocoa, CCN-51

DESCRIPTION:

The first stage of cocoa processing to chocolate is known as benefit and includes steps of fermentation and drying. It is known that these stages have a direct impact on sensory and functional qualities of the grain. However, studies don't involve genetic materials largely grown in Colombia as the CCN-51. Consequently, in this study were evaluated the effect of fermentation time and drying time on total polyphenol content and antioxidant capacity of cocoa clone CCN-51. The work was carried out using a multi-factorial experimental design (4 levels of fermentation and 3 levels of drying). Total polyphenol content and antioxidant capacity was determined using the Folin-Ciocalteu and ORAC method respectively. The effect of factors (fermentation and drying) on the response variables selected was determined by statistical analysis. In both cases the analysis of the results showed that fermentation and its quadratic effect are the variables with the greatest effect on the response variables. In addition, it was found that at two days of fermentation are achieved the higher values of total polyphenol concentration ($77,70 \pm 0,37$ mgEAG/gms) and antioxidant capacity ($1007,70 \pm 69,63$ μ molTE/gms) which are comparable with those reported for other types of cacao. Finally, were proposed two mathematical models to describe the variation of total polyphenols and antioxidant capacity with the days of fermentation; the respective adjustments (R^2) were 0,981 and 0,987.

* Undergraduate Project

** Faculty of Physicochemical Engineering. Department of Chemical Engineering. Advisor: Luis Javier Lopez Giraldo. Co Advisor: Andrea Katherine Pallares Pallares.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país privilegiado por su ubicación geográfica, que le permite entre otros, el cultivo de especies tropicales como el cacao. Se estima que en el territorio nacional hay 25 000 productores de cacao ([Espinal et al., 2005](#)), por lo que su cultivo se considera como una de las actividades económicas principales para un gran número de familias campesinas.

En el mundo el 70% de la producción de cacao se concentra en África del oeste, mientras que Colombia ocupa el noveno puesto ([Finagro, 2012](#)). El departamento de Santander ha sido el principal productor de cacao del país, con un aporte del 27,59% de la producción nacional en el año 2011 ([Agronet, 2011](#)).

Existen tres variedades principales de cacao: Criollo (5% de la producción mundial), Forastero o Amazónico que es el más común y Trinitario, un híbrido entre criollo y forastero que lo hace más resistente a las enfermedades ([Afoakwa, 2010](#)). El cacao es susceptible a diversas enfermedades que pueden ser originadas por hongos, bacterias o insectos. Las que más afectan los cultivos colombianos son Moniliasis causada por el hongo *Moniliophthora roreri* y Escoba de Bruja cuyo agente es el hongo *Crinipellis pernicioso* ([Porras & Sanchez, 1991](#)).

Entre las estrategias para reducir las enfermedades se encuentran las buenas prácticas agronómicas y el desarrollo de materiales genéticos más resistentes a éstas últimas. En ese sentido, la Federación Nacional de Cacaoteros recomienda el uso de 22 clones de cacao, entre los que sobresale el CCN-51 (Colección Castro Naranjal). Éste es un clon de cacao de origen ecuatoriano considerado de alta productividad y tolerante a las enfermedades ([Anecacao, 2013](#)). Varias investigaciones han demostrado que el CCN-51 es altamente resistente a la

escoba de bruja (Amores *et al.*, 2010; Bastos & Albuquerque, 2005). En Colombia su cultivo es muy frecuente y es recomendado para las 4 zonas agroecológicas (Finagro, 2012). Pese a sus buenas cualidades físicas (tamaño grande y homogeneidad, resistencia a enfermedades), presenta bajas tonalidades de sabor a fruta y rasgos florales, por lo que no se clasifica como una variedad de buen sabor en el mercado (Amores *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2010). Sin embargo, el cacao no es solamente apreciado por sus características sensoriales sino también por sus características funcionales. En este último aspecto, se ha reconocido que el cacao puede considerarse como un alimento funcional gracias a que es una fuente natural de polifenoles (Afoakwa, 2010).

Sin importar el material o clon de cacao, sus características sensoriales y funcionales están ligadas al proceso de beneficio (fermentación y secado).

La fermentación es la primera etapa en el beneficio del cacao y en sinergia con el tostado son las etapas principales para la formación del *flavour* (Frauendorfer & Schieberle, 2008). Se realiza de diferentes maneras dependiendo del productor y de la variedad, generalmente dura entre 6 y 8 días. Se puede llevar a cabo en cajones de madera que se cubren con hojas de bananero o con plástico para proteger de los insectos y conservar el calor, además se debe permitir el drenaje de los líquidos de la pulpa (Owusu, 2010). Durante la fermentación ocurren diversas reacciones de índole enzimática, que se producen espontáneamente debido a que la pulpa posee microorganismos (Godinez, 1970).

Los azúcares presentes en el mucílago por acción de las levaduras y bacterias producen principalmente etanol y ácido acético (Owusu, 2010). Los taninos contenidos en el grano mediante hidrólisis producen monosacáridos y polifenoles de bajo peso molecular que se difunden a través de la célula y se unen a las proteínas para formar compuestos menos solubles, así se elimina el sabor

astringente. Los azúcares contenidos en el interior del grano, así como las proteínas también sufren cambios químicos en los que se forman los precursores del aroma que darán el *flavour* característico durante las reacciones de Maillard en la etapa de tostado del cacao ([Godinez, 1970](#); [Afoakwa et al., 2009](#)).

Los polifenoles en los granos de cacao sufren una reacción de oxidación que puede ser enzimática (acción de la enzima polifenoloxidasas) y no enzimática. La polifenoloxidasas se inactiva a medida que la fermentación se desarrolla (50% el primer día de fermentación y el 6% el segundo día ([Hii et al., 2009](#))). Durante la fermentación se produce una pérdida importante de polifenoles, principalmente por difusión en los drenajes de la fermentación ([Hii et al., 2009](#)) y por polimerización oxidativa ([Counet et al., 2004](#)).

Luego de la cosecha y antes de su beneficio, al clon CCN-51 se le realiza un pretratamiento que busca eliminar el exceso de mucílago. En el pretratamiento los granos de cacao son dispuestos en mallas y se dejan escurrir sobre un entablado durante la noche; al día siguiente se realiza un presecado en el que los granos se dejan al sol por 30 horas. Posterior a este proceso, los granos de cacao ingresan al cajón para continuar con el proceso de fermentación ([Cana Cacao, 2013](#)).

En el secado los granos fermentados se exponen al sol, generalmente en casa elba de madera. El secado es importante para la estabilización del grano, almacenamiento, transporte, desarrollo del color marrón chocolate (debido a la reacción de la proteína quinona) y finalmente para el desprendimiento de la cáscara de la semilla ([Owusu, 2010](#)).

El secado puede durar de 3 a 5 días, incrementando el tiempo de exposición al sol a medida que transcurren los días. El proceso de secado debe hacerse de forma paulatina ya que si se hace muy rápido promueve cambios oxidativos y la

destrucción de los precursores del aroma, la piel de los granos se arruga y se retiene ácido acético, dando granos de sabor ácido y amargo. Por otra parte si el secado es muy lento se pueden desarrollar mohos y malos olores; el desarrollo del moho se ha relacionado con las altas concentraciones de metil-cetonas y aldehídos volátiles. Además, el secado también disminuye los polifenoles totales (Afoakwa *et al.*, 2009).

Los polifenoles constituyen entre el 12-18 % del peso seco del grano de cacao en verde (Hii *et al.*, 2009). De manera general, los polifenoles presentes en los granos de cacao son flavanoles (también conocidos como flavan-3-oles o catequinas) una subclase de los flavonoides. Los flavanoles pueden ser (i) monoméricos (en el cacao se encuentran (-)-epicatequina y (+)-catequina), (ii) dímeros (los más comunes en cacao son B2 y B5), (iii) combinaciones poliméricas de éstos monómeros en cadenas de hasta más de diez unidades conocidos como procianidinas y en menor proporción (iv) mezclas de monómeros con ácido gálico (galocatequina y epicagalocatequina) (Cooper *et al.*, 2008).

De manera general, los polifenoles son antioxidantes fuertes que complementan las funciones de las vitaminas y actúan como defensa contra el estrés oxidativo causado por el exceso de especies reactivas del oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés). Se considera que su inclusión en la dieta trae beneficios para la salud como la prevención de enfermedades degenerativas, en particular el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas (Tsao, 2010).

La capacidad antioxidante de los flavanoles está basada en su estructura característica, incluyendo la hidroxilación del sistema de anillo básico flavan, especialmente 3',4'-dihidroxilación del anillo B (estructura catecol), la longitud de la cadena del oligómero y las características estereoquímicas de la molécula (ver

Anexo 1). Las características moleculares de los flavonoides son la base para explicar su capacidad de estabilizar radicales libres (iniciadores de los procesos de oxidación), así como sus propiedades quelantes (Keen *et al.*, 2005).

En el caso del cacao, se ha atribuido a las procianidinas ser las principales responsables de la capacidad antioxidante; esta capacidad también podría estar relacionada con su grado de polimerización (Ortega *et al.*, 2008). Las procianidinas no solo imparten la astringencia y el amargor al chocolate, sino también su excepcional capacidad antioxidante (Counet *et al.*, 2004). Los polifenoles del cacao se han relacionado con la protección de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a causa del estrés oxidativo (Ortega *et al.*, 2008).

A pesar de que se ha demostrado que todos los polifenoles tienen capacidad antioxidante *in vitro*, aún no se puede afirmar que éstos tengan un efecto antioxidante *in vivo* (Cooper *et al.*, 2008) salvo para los flavonoides y procianidinas del cacao (Keen *et al.*, 2005). En este sentido, Keen *et al.*, (2005) han demostrado que flavanoles y procianidinas extraídas y purificadas a partir de granos de cacao tienen una influencia en el sistema cardiovascular y disminuyen la reactividad plaquetaria.

En 1999 Adamson *et al.* encontraron una correlación directa entre los niveles de procianidina y la capacidad antioxidante de granos de cacao provenientes de Brasil. Dado que muchos de los beneficios de la salud están asociados con los polifenoles, el contenido de procianidinas podría ser un indicador de una potencial actividad biológica.

Los polifenoles han sido investigados principalmente por su efecto sobre el sistema vascular. Varios estudios han demostrado mejora de la función endotelial

tras el consumo de cacao, la cual es un biomarcador muy prometedor para predecir el riesgo de ataque al corazón. Otros efectos relacionados con la reducción de riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD por sus siglas en inglés) incluyen la disminución de la susceptibilidad de la LDL a la oxidación (Cooper *et al.*, 2008).

De los párrafos anteriores se infiere que el beneficio de los granos de cacao no sólo tendrá una incidencia sobre las características sensoriales sino también funcionales. A pesar que existen estudios sensoriales del clon CCN-51 (Amores *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2010), a lo mejor del conocimiento del autor no hay estudios del efecto de las condiciones de beneficio sobre la calidad del grano desde el punto de vista funcional. Además, los estudios del impacto del beneficio del grano sobre las características sensoriales han sido desarrollados empleando condiciones de fermentación y secado típicas para otro tipo de variedades. En ese sentido, es necesario tener presente que para el clon CCN-51 se deberán diseñar sistemas de beneficio que estén acordes con su exceso de mucílago.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar la variación del contenido de polifenoles totales y de la capacidad antioxidante durante la fermentación y el secado del grano de cacao CCN-51. Se espera que los resultados obtenidos contribuyan con el desarrollo de la cadena del cacao-chocolate, la cual en su agenda prioriza entre otros proyectos: “Producción de sustancias bioactivas para el desarrollo de alimentos funcionales” (Uribe *et al.*, 2011).

Aunque no hace parte del alcance de este trabajo, es importante mencionar que actualmente se está desarrollando un trabajo en el Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICTA) en el cual se evalúa el impacto de las condiciones de beneficio sobre el *flavour* de cacao del clon CCN.51.

1. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En esta sección se relacionan y describen cada una de las etapas que se siguieron para evaluar el impacto de las condiciones de beneficio (fermentación y secado) del grano de cacao CCN-51 sobre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante (en adelante PT y CA, respectivamente). Es importante resaltar que se realizaron dos muestreos en épocas diferentes del año y que cada muestra fue analizada al menos por duplicado.

1.1 REACTIVOS

Se utilizaron los siguientes reactivos: n-hexano, etanol, ácido gálico, carbonato de sodio y reactivo de Folin-Ciocalteu adquiridos en Merk. Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®), fluoresceína sódica, 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) y solución buffer de fosfato (pH 7,2) adquiridos en Sigma-Aldrich. Todos los reactivos fueron de grado analítico.

1.2 EQUIPOS DE LABORATORIO

Balanza analítica PA214 marca Ohaus, baño ultrasónico LC30H marca Elma Ultrasonics, centrífuga Heraeus Megafuge 16R marca Thermo Fisher Scientific, placa de calentamiento MR Hei-Tec marca Heidolp, rotoevaporador R-210 marca Büchi, vortex SG23 marca Schott Gerate, espectrofotómetro Genesys 20 marca Thermo Spectronic, espectrofluorímetro Fluoroskan Ascent marca Thermo Scientific.

1.3 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Para determinar el efecto del tiempo de fermentación y de secado sobre el contenido de PT y la CA, se empleó un diseño factorial multinivel. Los factores y niveles empleados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental

Factores	Símbolo	Unidades	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Tiempo de Fermentación	F	día	2	4	6	8
Tiempo de Secado	S	día	1	3	5	-

El efecto de las variables y sus interacciones sobre el contenido de PT y la CA se evaluó mediante el análisis de varianza ANOVA. Se realizó la prueba Tukey HSD para identificar diferencias significativas entre los valores promedio de las variables evaluadas. En el desarrollo de los análisis descritos se empleó el software STATGRAPHICS Centurión XVI versión de prueba para Windows.

1.4 RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Las muestras de cacao fueron recolectadas en la Finca Villa Mónica, propiedad de Fedecacao, ubicada en la vereda Mérida del municipio de San Vicente de Chucurí en el departamento de Santander (693msnm, T_{media} 27°C). Allí mismo se realizaron las actividades de beneficio que comprendieron la fermentación y el secado de los granos, para lo cual se siguió el protocolo de microfermentación propuesto por Fedecacao (Martínez, 2012).

Para cada muestra se recogieron entre 20 y 22 mazorcas con un grado de madurez homogéneo, que se desgranaron en las 24 horas siguientes a su

recolección. Los granos rodeados de mucílago se introdujeron en mallas plásticas de 25x50cm, llegando a un peso aproximado de 2,5kg de masa fresca de cacao/muestra. Posteriormente las muestras se dejaron escurrir por 16-18 horas y luego se presecaron en la casa elba por 30 horas. En este punto se recolectaron las muestras denominadas F2. Las demás muestras se llevaron al cajón de madera en el cual se encontraba una masa total fermentable superior a 200kg.

En el cajón las mallas se ubicaron de forma escalonada dentro de la masa total fermentable. La primera remoción se realizó a las 48 horas y luego se realizaron remociones o volteos cada 24 horas hasta completar los 6 días de fermentación. Durante este periodo se recogieron las muestras F4 y F6 de acuerdo con el diseño de experimentos. Al final se recolectaron las muestras con fermentación completa, F8.

Cada una de las muestras con diferentes días de fermentación (F2-F8) fue etiquetada y llevada a la casa elba con techo móvil de madera para realizar el secado al sol. El tiempo de exposición al sol fue de 1, 3 ó 5 días (denominado S1, S3 y S5, respectivamente). Durante el secado el número de remociones se incrementó, mientras que el espesor de la capa de granos expuesta disminuyó, con el transcurrir de los días.

1.5 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

La extracción de PT se llevó a cabo en dos etapas generales (acondicionamiento de la materia prima y preparación de extractos polifenólicos), que se detallan a continuación. En ambos casos se siguió el procedimiento propuesto por [Cadena y Herrera \(2008\)](#).

1.5.1 Acondicionamiento de la materia prima. Inicialmente se tomaron 50g de muestra los cuales se descascarillaron, molieron y cuartearon hasta obtener 1g que posteriormente se mezcló con 10ml de n-hexano y se llevó a baño ultrasónico por 15min a 30°C. Luego se centrifugó a 3 500 rpm durante 15min a 25°C. Se retiró el sobrenadante y se repitió el procedimiento tres veces. Finalmente la muestra se secó al aire durante 1 hora para eliminar el exceso de n-hexano.

La materia prima fue caracterizada empleando el método AOAC 931.04 18th para la determinación de humedad.

1.5.2 Preparación de extractos polifenólicos. La muestra desengrasada se mezcló con 20ml de solución etanol/agua (80:20 v/v) y se calentó por 15min a 60°C con agitación continua. Posteriormente se centrifugó a 3 500 rpm durante 15 min a 25°C. El sobrenadante se pasó por un papel de filtro y se recolectó protegido de la luz; el procedimiento se repitió tres veces. A continuación se concentró utilizando un rotoevaporador a 50°C y 100mbar luego se diluyó utilizando una solución etanol/agua (50:50 v/v) hasta llevarlo a un volumen final de 25ml. El extracto obtenido se almacenó en un frasco ámbar a 4°C hasta su uso. Por cada una de las muestras se obtuvieron dos extractos.

1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS

1.6.1 Determinación de polifenoles totales. La determinación de PT se realizó empleando el ensayo de Folin-Ciocalteu, siguiendo el procedimiento descrito por [Wollgast \(2004\)](#). Brevemente, 1,5ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 10 veces en agua destilada), 1,5ml de solución de carbonato de sodio (7,5% p/v) y 50µl del extracto a valorar fueron mezclados vigorosamente. La mezcla se

almacenó en condiciones de oscuridad durante 1 hora y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 765nm.

Para la cuantificación del contenido de PT se construyó una curva patrón (relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la sustancia de referencia) en la que se empleó como sustancia de referencia el Ácido Gálico (AG). El procedimiento experimental empleado fue idéntico al descrito anteriormente. La única diferencia es que en lugar de extracto a valorar se empleó la sustancia de referencia. Finalmente, el contenido de PT fue calculado empleando la Ecuación 1 y expresado en mg Equivalentes de Ácido Gálico (mgEAG) por gramo de muestra seca (gms).

Ecuación 1. Expresión para calcular el contenido de polifenoles totales PT [mgEAG/gms] con el ensayo Folin-Ciocalteu

$$PT = \frac{(Abs_{muestra} - b) / m}{g_{muestra\ seca}} \times 25ml \times F$$

En donde: g peso de la muestra [gramos], m y b representan respectivamente la pendiente y el intercepto de la curva patrón y F factor de dilución de la muestra

1.6.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante. Se utilizó el método ORAC siguiendo el procedimiento descrito por (Huang *et al.*, 2002). En los pozos de una microplaca oscura de 96 lugares se adicionaron los reactivos, en el orden que se especifica a continuación: 150µl de solución de fluoresceína [$8,16 \times 10^{-5}$ mM], 25µl de Trolox® [6,25 - 50µM], extracto [0,0468 - 0,1238 mgEAG/gms], o buffer de fosfato (según fuera a ubicarse en el pozo el estándar, la muestra o el blanco del ensayo, respectivamente) y 25µl de solución de AAPH [153mM]. Antes de añadir el AAPH, la microplaca con la fluoresceína y el antioxidante fue precalentada a 37°C durante 10min. Inmediatamente después de la adición del iniciador de

radicales, se midió en el espectrofluorímetro la señal de fluorescencia cada minuto durante 1 hora. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 485 y 530nm, respectivamente. Cada concentración evaluada se analizó por triplicado. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol Trolox-Equivalente} / \text{g muestra seca}$ [$\mu\text{molTE/gms}$] (el procedimiento de cálculo se presenta con más detalle en el Anexo 4).

1.7 MODELOS MATEMÁTICOS PARA EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

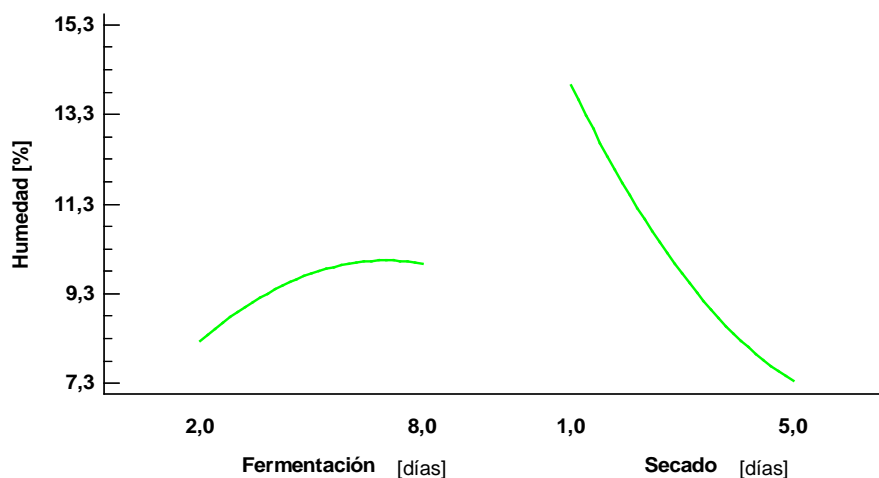
Para relacionar el contenido de PT y la CA con los días de fermentación (F), se establecieron dos modelos matemáticos unifactor del tipo recíproco que fueron ajustados utilizando el método Levenberg-Marquardt. Para el ajuste se empleó el software STATGRAPHICS Centurión XVI versión de prueba para Windows.

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

El contenido de humedad de los granos de cacao varía durante el beneficio. En la Figura 1 se observa la influencia de los factores en forma individual sobre el porcentaje de humedad. Se evidencia que la variable evaluada disminuye con el aumento en los días de secado; este comportamiento es el típico durante el desarrollo de esta parte del beneficio. Para el caso de la fermentación, su tendencia es congruente con lo reportado en la bibliografía, en la que se afirma que la humedad permanece más o menos constante durante este proceso, con un ligero incremento hacia el final del mismo (Rodríguez, 2011).

Figura 1. Diagrama de efectos principales de la fermentación y el secado sobre el porcentaje de humedad de los granos de cacao



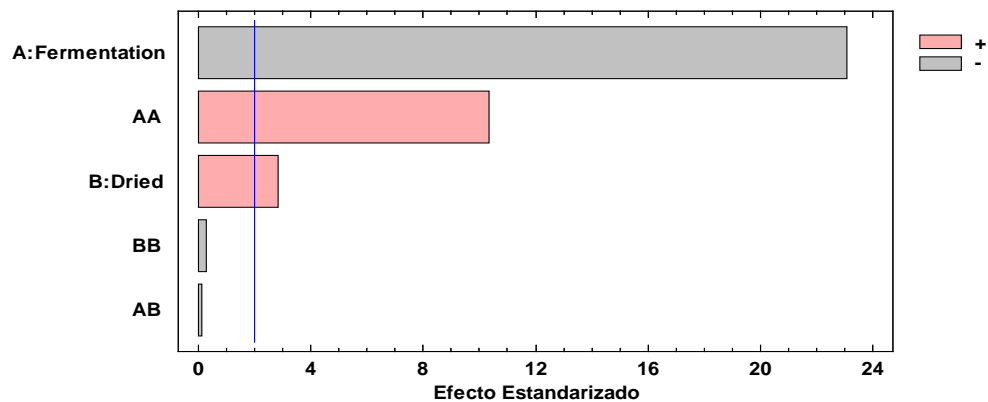
En las muestras con diferentes días de fermentación pero que coincidieron con uno, tres o cinco días de secado (S1, S3 o S5) el porcentaje de humedad promedio fue de $13,60 \pm 1,77$, $9,40 \pm 1,48$ y $7,00 \pm 0,66\%$, respectivamente. Al

comparar el valor de humedad a los 5 días de secado con el valor típico de 7,5% reportado por [Afoakwa y Owusu \(2010\)](#) se constata que los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos para otros materiales. Además, la disminución del porcentaje de humedad entre días de secado es lenta, lo cual eventualmente garantizará una mejor calidad del grano desde el punto de vista sensorial y funcional.

2.2 CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 2) se infiere que la fermentación, su efecto cuadrático y el secado tienen incidencia significativa sobre el contenido de PT.

Figura 2. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados del contenido de polifenoles totales



El análisis de varianza ANOVA confirma el resultado anterior con un nivel de confianza del 95% (valor $P < 0,05$, Tabla 2). No obstante, tal como se observa en la Tabla 2 la contribución del secado es mínima, con un valor de razón F notablemente inferior comparado con el de la fermentación y su efecto cuadrático. Diferentes autores han encontrado que durante el beneficio del cacao la mayor

pérdida de polifenoles se presenta en la fermentación (Nazaruddin *et al.*, 2006; Gil, 2012), mientras que el secado natural al sol ayuda a conservarlos (Efraim *et al.*, 2010).

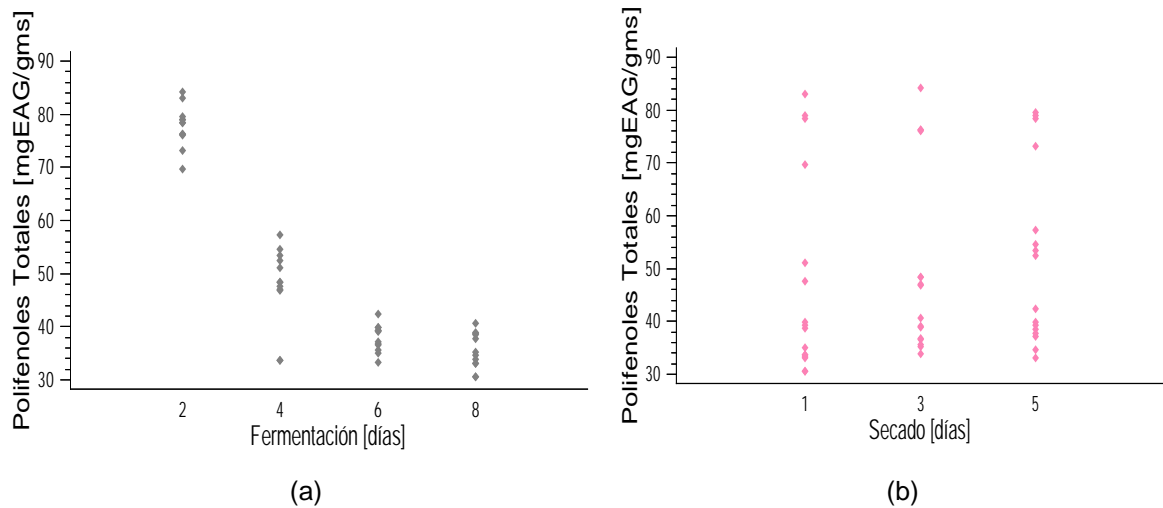
Tabla 2. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de polifenoles totales

Factores	SC	GL	SMC	Razón F	Valor P
A:Fermentación	11 201,700	1	11 201,700	531,58	0,0000
B:Secado	170,025	1	170,025	8,07	0,0069
AA	2 263,570	1	2 263,570	107,42	0,0000
AB	0,364	1	0,364	0,02	0,8960
BB	1,598	1	1,598	0,08	0,7844
Error	885,042	42	21,072		
Total	14 522,300	47			

En la Figura 3 se presentan los diagramas de dispersión para el contenido de PT con respecto a las variables independientes. Para el caso de la fermentación su efecto sobre los PT es inverso (Figura 3a), mientras que el secado no presenta una clara correlación con la variable de respuesta (Figura 3b).

Figura 3. Diagramas de dispersión para el contenido de Polifenoles Totales

(a) en función de Fermentación [días], (b) en función de Secado [días]



Los resultados obtenidos, junto al análisis de variabilidad de medias, se resumen en la Tabla 3. Un análisis más detallado de la variación de PT en función de los días de fermentación y secado (Tabla 3) confirma que este último no tiene incidencia significativa sobre el contenido de PT. Por ejemplo, la letra (a) en las muestras con 2 días de fermentación representa (de acuerdo con el análisis Tukey HSD) que no existen diferencias significativas entre las medias con el mismo tiempo de fermentación y distinto tiempo de secado.

Se presentó una diferencia significativa para la muestra con 4 días de fermentación y 1 día de secado (F4S1). En este caso la letra (b) indica un contenido de polifenoles similar al de las muestras con 6 y 8 días de fermentación. Lo anterior se debe al menor contenido en componentes particulares ((+)-catequina, (-)-epicatequina y procianidinas) de esta muestra comparada con las demás al mismo nivel de fermentación (F4) (Datos no mostrados, procedentes de un proyecto en curso), que la convierten en una muestra atípica del presente estudio.

Tabla 3. Contenido de polifenoles totales para cada uno de los puntos experimentales

		Secado [días]			PT mgEAG/gms
		1	3	5	
Fermentación [días]	2	77,50±5,59 a	78,13±4,01 a	77,49±2,97 a	77,71±0,37
	4	41,52±9,16 b,c	47,60±0,84 c,d	54,43±2,10 d	47,85±6,46
	6	36,89±3,20 B	37,02±1,51 b	39,71±2,15 b,c	37,88±1,59
	8	33,27±3,83 B	37,20±3,14 b	35,99±2,48 b	35,49±2,01

* Los valores de la fila con la misma letra no tienen diferencias significativas en su media ($p < 0,05$)

De acuerdo con los resultados de la Tabla 3 la disminución más drástica de polifenoles se presenta entre el segundo y el cuarto día de fermentación con un 38%; a partir de ese día el contenido de polifenoles continúa reduciéndose de

manera gradual hasta llegar, en el octavo día al 54% de su valor inicial. Resultado que concuerda con lo reportado por [Efraim *et al.*, \(2010\)](#) en el que el contenido de polifenoles disminuyó 59% en un cacao forastero después de siete días de fermentación.

Con respecto a otros autores, los valores encontrados en el presente trabajo son comparables. Por ejemplo, [Serra y Ventura, \(1997\)](#) encontraron un contenido de PT de $43,1 \pm 1,87$ mgEAG/g en cacao con 5 a 6 días de fermentación. [Tomas-Barberán *et al.*, \(2007\)](#) hallaron un contenido de PT de $81,4 \pm 3,7$ mgEAG/g en cacao Amazónico colombiano no fermentado y secado al sol.

2.2.1 Modelo matemático de la cinética del contenido de polifenoles totales.

El modelo matemático planteado para relacionar la variación del contenido de PT con los días de fermentación (F) (Ecuación 2) tuvo un coeficiente de correlación ajustado (R^2) de 0,981. Se construyó la Figura 4, en la que se observa el ajuste del modelo propuesto junto a los datos experimentales.

Ecuación 2. Modelo matemático de la cinética del contenido de polifenoles totales PT [mgEAG/gms] en función del tiempo de fermentación F [días]

$$PT = \frac{1}{0,007155 + (0,003017 \times F^{1,0066})}$$

A pesar que el modelo fue ajustado con valores propios del clon de cacao CCN-51 también permite predecir la evolución del contenido de PT de variedades Forastero y Amazónico con una desviación de error relativo promedio del 20% (ver Tabla 4).

Figura 4. Modelo matemático de la cinética del contenido de polifenoles totales en función del tiempo de fermentación

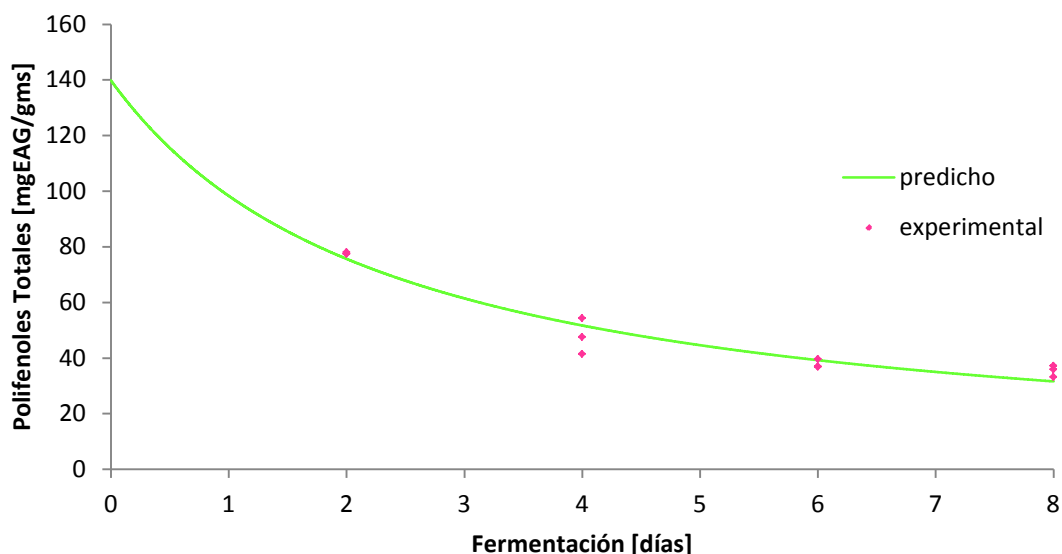


Tabla 4. Error relativo porcentual de polifenoles totales reportados por otros autores y polifenoles totales calculados con la ecuación 2, para diferentes materiales de cacao

F [días]	Tipo Cacao	PT [mgEAG/gms] reportado	PT [mgEAG/gms] calculado	ER	Fuente
0	Forastero	120,00	139,76	16%	Kim y Keneey 1984
0	no reportado	135,00	139,76	4%	Serra y Ventura 1997
5	no reportado	43,10	44,64	4%	Serra y Ventura 1997
0	no reportado	140,00	139,76	0%	Misnawi et al., 2002
0	Amazónico	81,40	139,76	72%	Tomás-Barberan et al., 2007
0	Forastero	108,76	139,76	29%	Efraim et al., 2010
3	Forastero	71,42	61,46	14%	Efraim et al., 2010
7	Forastero	44,55	35,03	21%	Efraim et al., 2010
0	híbrido forastero	180,87	139,76	23%	Afoakwa et al., 2012
ER Promedio				20%	

2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Si bien el análisis de varianza ANOVA (Tabla 5) indica que todas las variables y sus interacciones inciden sobre la CA con un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$), el valor F de la fermentación tanto en su contribución sencilla como cuadrática es superior al de las demás variables.

Tabla 5. Análisis de varianza ANOVA para la capacidad antioxidante

Factores	SC	GL	SMC	Razón F	Valor P
A:Fermentación	2 588 680	1	2 588 680	632,41	0,0000
B:Secado	89 292	1	89 292	21,81	0,0000
AA	340 486	1	340 486	83,18	0,0000
AB	22 592	1	22 592	5,52	0,0236
BB	20 654	1	20 654	5,05	0,0300
Error	171 922	42	4 093		
Total	3 233 630	47			

El diagrama de Pareto (Figura 5) confirma el resultado del ANOVA. En la Figura 6 se presentan los gráficos de dispersión de la CA con respecto a la fermentación y al secado por separado, en los cuales se observa que al igual que como ocurre con los PT, a medida que avanza la fermentación disminuye la CA (Figura 6a), mientras que el secado no tiene un efecto definido sobre dicha variable (Figura 6b).

Figura 5. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados de la capacidad antioxidante

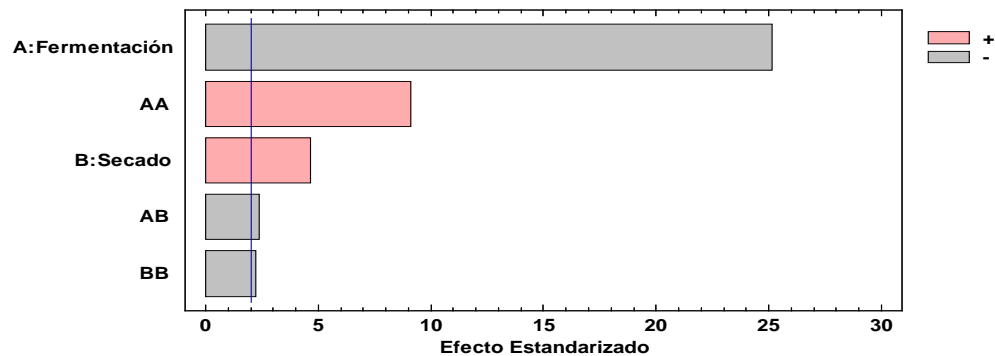
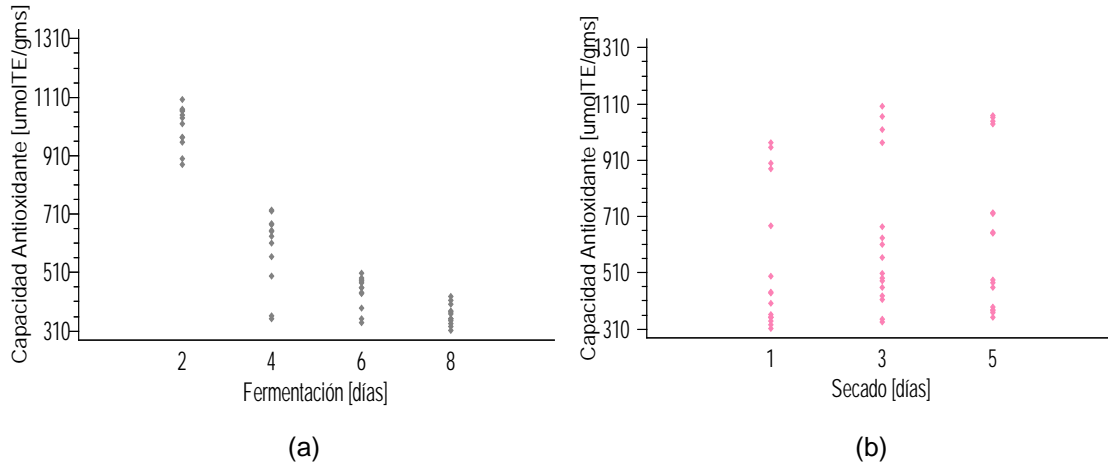


Figura 6. Diagramas de dispersión para la Capacidad Antioxidante

(a) En función de Fermentación [días], (b) En función de Secado [días]



En la Tabla 6 se presentan los valores de la CA calculados con el método ORAC, expresados en $\mu\text{molTE/gms}$. De acuerdo con el resultado de la prueba Tukey HSD, a pesar de que se presentan diferencias en las medias de las muestras F4S3 y F6S3 con respecto a las demás con el mismo nivel de fermentación, éstas no son significativas. Tal como se observa, las muestras aún se encuentran en el promedio (letras (b) y (d), respectivamente). Nuevamente la muestra F4S1 tiene una CA comparable a las muestras con mayor tiempo de fermentación (letra (d)), resultado que se debe a su menor contenido de PT, como se discutió en la sección anterior (muestra atípica).

Tabla 6. Capacidad antioxidante calculada por el método ORAC para cada uno de los puntos experimentales

		Secado [días]			CA [$\mu\text{molTE/gms}$]
		1	3	5	
Fermentación [días]	2	927,77±45,37 a*	1040,20±56,16 a	1055,16±14,39 a	1 007,71±70,74
	4	427,16±153,18 d	620,33±46,24 b,c	687,23±40,30 b	593,24±127,42
	6	392,20±55,47 d	485,33±20,35 c,d	451,44±44,16 d	442,99±55,68
	8	347,25±40,71 d	380,84±48,41 d	368,15±11,67 d	365,41±36,57

* Los valores de la fila con la misma letra no tienen diferencias significativas en su media ($p < 0,05$)

La tendencia de reducción de la CA es comparable a la presentada en la disminución del contenido de PT. La mayor disminución se presenta entre el segundo y el cuarto día de fermentación, siendo del 41%, mientras que la reducción total entre el segundo y el octavo día es del 64%.

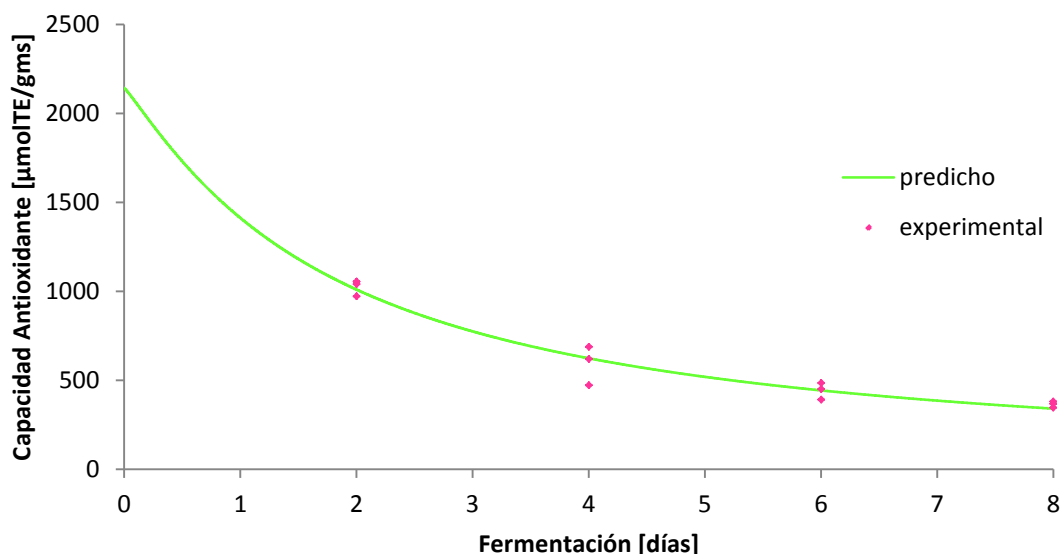
Se conoce que el tratamiento industrial disminuye la CA. Por ejemplo, [Gu et al., \(2006\)](#) encontraron valores de 218 ± 76 y 73 ± 8 $\mu\text{molTE/gms}$ en chocolate negro y de leche, respectivamente. Así mismo [Adamson et al., \(1999\)](#) reportaron un valor de $131,2$ $\mu\text{molTE/gms}$ para chocolate negro. Como es de esperarse los valores son inferiores a los encontrados en el presente proyecto y en consecuencia podría postularse que una posible utilización de estos extractos sea el enriquecimiento desde el punto de vista funcional de productos procesados.

2.3.1 Modelo matemático de la cinética de la capacidad antioxidante. El modelo matemático resultado del ajuste descrito en la sección 1.7 se presenta en la Ecuación 3 con un coeficiente de correlación ajustado (R^2) de 0,9871. La Figura 7 muestra el grado de ajuste del modelo con los datos experimentales.

Ecuación 3. Modelo matemático de la cinética de la capacidad antioxidante CA [$\mu\text{molTE/gms}$] en función del tiempo de fermentación F [días]

$$CA = \frac{1}{0,000466755 + 0,000241133 \times F^{1,118}}$$

Figura 7. Modelo matemático de la cinética de la capacidad antioxidante en función del tiempo de fermentación



Gil (2012) reporta valores de CA para cacao colombiano con diferentes días de fermentación. Al comparar los valores hallados por dicho autor con los valores predichos con la ecuación 3, se obtiene un error relativo porcentual promedio del 16% (Tabla 7). Por lo cual es posible la utilización de esta ecuación para predecir la CA de clones de cacao diferentes al CCN-51.

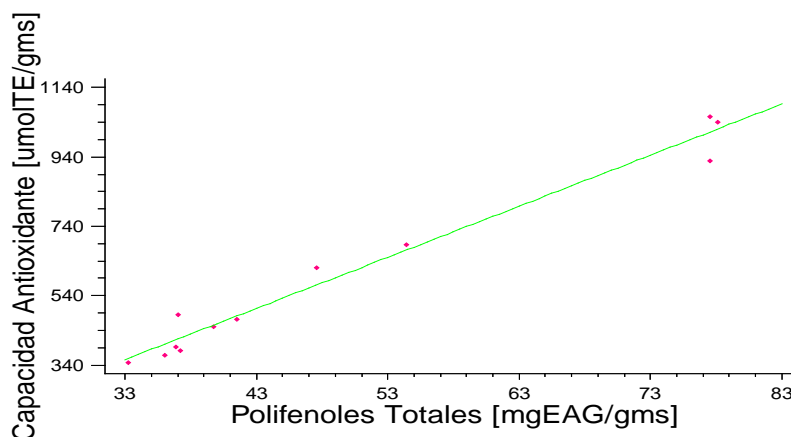
Tabla 7. Error relativo porcentual de la capacidad antioxidante para cacao colombiano (fuente Gil, 2012) y la capacidad antioxidante calculada con la ecuación 3.

Fermentación [días]	CA [μmolTE/gms] reportado	CA [μmolTE/gms] Calculado	ER
2	920,00	1 009,97	10%
3	750,00	775,02	3%
4	740,00	623,94	16%
5	800,00	519,59	35%
Promedio			16%

2.4 RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Al establecer el tipo de relación entre el contenido de PT y la CA, se encuentra que existe una correlación directamente proporcional con un grado de ajuste (R^2) de 0,97 (ver Figura 8). Este resultado era de esperarse, pues previamente la CA se ha relacionado con el contenido de PT. Diferentes autores han correlacionado la CA con el contenido de procianidinas. [Adamson et al., 1999](#) y [Gu et al., 2006](#) encontraron una relación lineal entre estas dos variables para diferentes productos de cacao ($R^2=0,994$ y $R^2=0,923$). [Miller et al., 2006](#) correlacionaron la CA determinada por el método ORAC con el contenido de sólidos de cacao libres de grasa (NFCS de sus siglas en inglés) para diferentes productos de chocolate y encontraron un R^2 de 0,9849; a su vez el contenido de NFCS fue directamente proporcional al contenido de PT, específicamente al de procianidinas ($R^2=0,946$). Para licor de cacao criollo, trinitario, forastero y nacional [Counet et al., 2004](#) encontraron una correlación positiva entre el nivel de procianidinas y el tiempo de inhibición de la oxidación por el método ORAC ($R^2=0,9362$). Resultados que son comparables con los obtenidos en el presente trabajo, teniendo en cuenta que las procianidinas se encuentran dentro de los polifenoles típicos del cacao ([Ortega et al., 2008](#)).

Figura 8. Relación entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante



La relación de CA por contenido de PT (CA/PT) de la muestra F2S5 de CCN-51 es 13,62 $\mu\text{molTE}/\text{mgEAG}$, la cual es equiparable a la del té verde que tiene un contenido de PT de 1400 mgEAG/L y una CA de 19500 $\mu\text{molTE}/\text{L}$ (CA/PT = 13,93 $\mu\text{molTE}/\text{mgEAG}$) ([Feria, 2011](#))

En el [2004 Parker](#) reportó que la CA de una mezcla de polifenoles es diferente a la suma de las CA por componente. Esta diferencia posiblemente se debe a que se producen interacciones entre componentes, que a su vez pueden ser sinérgicas o antagónicas. Es por esto que a pesar de que el contenido de PT en una muestra vegetal sea alto, su CA puede ser menor a la de otra muestra con un contenido inferior de PT. Lo anterior explica porqué la CA del clon CCN-51 puede llegar a ser mayor a la de otros materiales vegetales con mayor contenido de PT.

3. CONCLUSIONES

El contenido de PT y la CA del clon de cacao CCN-51 se ven afectados durante el proceso de fermentación y secado, siendo el tiempo de fermentación la variable que ejerce mayor incidencia. En efecto, a medida que aumentan los días de fermentación se observa que el contenido de PT y la CA disminuyen siguiendo un modelo del tipo recíproco. Se estableció que la disminución más marcada en ambas variables (PT y CA) se produce entre los días 2 y 4 de fermentación.

La CA determinada por el método ORAC presentó una relación directamente proporcional con el contenido de PT. Confirmándose que los polifenoles presentes en el grano de cacao le confieren su capacidad a inhibir procesos de oxidación iniciados por radicales libres.

El clon de cacao CCN-51 además de considerarse de alto rendimiento y resistente a las enfermedades, tiene un tenor en PT equivalente al de otras variedades y además su CA es comparable con otros tipos de cacao. La razón entre la CA por contenido de PT del clon de cacao CCN-51 es comparable a la de té verde.

4. RECOMENDACIONES

Incrementar la toma de datos experimentales para mejorar el ajuste del modelo matemático propuesto, teniendo en cuenta que después del día 4 de fermentación, el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante tienden a estabilizarse.

Realizar un estudio que incluya las muestras verdes (fermentación nula), de manera que se pueda comprobar el ajuste del modelo matemático para el punto denominado F0, en el cual se espera encontrar el máximo de polifenoles totales y de la capacidad antioxidante.

Continuar con el estudio de las características funcionales y organolépticas del clon de cacao CCN-51, con el fin de darle un valor agregado para beneficio de los productores y consumidores de productos de chocolate.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, G., Lazarus, S., Mitchell, A., Prior, R., Cao, G., Jacobs, P., Schmitz, H. (1999). HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, 4184-4188.
- Afoakwa, E. O. (2010). *Chocolate science and technology* (first ed.). Singapore: Wiley-blackwell a john wiley and sons, ltd., publication.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2009). Matrix effects on flavor volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC-mass spectrometry and GC-olfactometry. *Food chemistry*, 113, 208-215.
- Agronet. (2011). *Agronet ministerio de agricultura y desarrollo rural*. Retrieved 18 de 01 de 2012, de agonet:
<http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/VerReporte.aspx>
- Amores, F. M., Vasco, S. A., Eskes, A. B., Suarez, C., Quiroz, J. G., Loor, R. G., Quijano, G. C. (2010). On-farm and on-station selection of new cocoa varieties in Ecuador. *Final report of the CFC/ICCO/Bioversity international project on "cocoa productivity and quality improvement: a participatory approach"*, 59, 59-72. (A. B. Eskes, Ed.)
- Anecacao, (2013). Asociación nacional de exportadores de cacao. *Ecuador*. Retrieved 01 24, 2013, from Anecacao:
<http://www.anecacao.com/index.php/es/cacao-en-ecuador/el-cacao-ccn-51.html>
- AOAC, 2005, Official methods of analysis, (18th Ed). Horwitz, W. Official methods of analysis chemical

- Bastos, C. N., & Albuquerque, P. S. (2005). Evaluation of resistance of cocoa genotypes to witches broom disease (*crinipellis perniciososa*) using phloem sap. *Ingenic newsletter*, pp. 26-29.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355.
- Cadena, T., & Herrera, Y. (2008). *Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante*. Bucaramanga, Santander, Colombia: Universidad Industrial de Santander.
- Cana Cacao. (2013) Asociación cámara nacional de cacao fino de Costa Rica. Retrieved 01 24, 2013, from Cana Cacao:
<http://www.canacacao.org/contenido.item.50/fermentaci%F3n-especial-clon-ccn-51.html>
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., & Williamson, G. (2008). Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99, 1-11.
- Counet, C., Ouwerx, C., Rosoux, D., & Collin, S. (2004). Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 6243-6249.
- Efraim, P., Pezoa, N., Jardim, D., Nishikawa, A., Haddad, R., & Eberlin, M. (2010). Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 142-150.
- Espinal, C. F., Martínez, H. J., & Ortíz Hermida, L. (2005, 03). *Ministerio de agricultura y desarrollo rural observatorio agrocadenas colombia*. Retrieved 01 18, 2013, from agronet:
http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112145659_caracterizacion_cacao.pdf
- Feria Cardet, F. (2011). *Caracterización de la composición fenólica y capacidad antioxidante del té (camellia sinensis) en productos de diferentes marcas*

comercializadas en Chile. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas.

- Finagro. (2012). *Finagro fondo para el financiamiento del sector agropecuario*. Retrieved 10 20, 2012, from:
http://www.finagro.com.co/html/i_portals/index.php?p_origin=internal&p_name=content&p_id=MI-194&p_options=#CACAO
- Frauendorfer, F., & Schieberle, P. (2008). Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 10244-10251.
- Garcia, L. F., Guarda, D., Chavez, J., Rios, R., & Chia, J. (2010). Farmer participatory and on-station selection activities carried out at Universidad Nacional Agraria de la Selva, Peru. *Final report of the CFC/ICCO/Biodiversity international project on "cocoa productivity and quality improvement: a participatory approach"*, 59, 102-107. (A. B. Eskes, Ed.)
- Gil, J. A. (2012). *Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre industrialización*. Medellín, Colombia.
- Godinez, L. (1970). *Estudio del comportamiento de azúcares y aminoácidos durante la fermentación y tostación del grano de cacao, aplicando técnicas cromatográficas*. Puebla, México: Universidad Autónoma de Puebla.
- Gu, L., House, S., Wu, X., Ou, B., & Prior, R. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 4057-4061.
- Hii, C. L., Law, C. L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian journal of food and agro-industry*, 2, 702-722.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., & Prior, R. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence

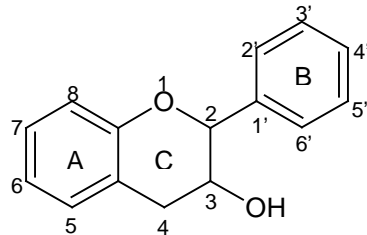
- reader in 96-well format. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 4437-4444.
- Keen, C. L., Holt, R. R., Oteiza, P. I., Fraga, C. G., & Schmitz, H. H. (2005). Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, suppl 298S-303S.
- Martinez G., N. (2012). *Protocolo para fermentación de muestras de cacao*. Federación Nacional de Cacaoteros, Departamento de Investigación.
- Miller, K., Stuart, D., Smith, N., Lee, C., Michale, N., Flanagan, J., et al. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4062-4068.
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24, 87-94.
- Ortega, N., Romero, M. P., Macia, A., Reguant, J., Angles, N., Morello, J. R., & Motilva, M. J. (2008). Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 9621-9627.
- Owusu, M. (2010). *Influence of raw material and processing on aroma in chocolate*, Ph.D. thesis Faculty of life science, University of Copenhagen. Copenhagen, Denmark.
- Parker, T. (2011). *Patent No. US 2011/0136245 A1*. United States.
- Porrás, V., & Sánchez, J. (1991). *Enfermedades del Cacao*. Retrieved 01 24, 2013, from: <http://books.google.com.co>
- Rodríguez, J. (2011). *Estudio de los compuestos volátiles de Theobroma Cacao L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado*. México, DF, México: Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

- Serra, B., & Ventura, C. (1997). Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chemistry*, 60, 365-370.
- Tomas-Barbern, F., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marn, A., Mugerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerd, B., Espn, J. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 3926-2935.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Uribe, C., Fonseca, S., Bernal, G., Contreras, C., & Castellanos, O. (2011). *Sembrando innovación para la competitividad del sector agropecuario colombiano*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Wollgast, J. (2004). *The contents and effects of polyphenols in chocolate. Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health*. Alemania.

ANEXOS

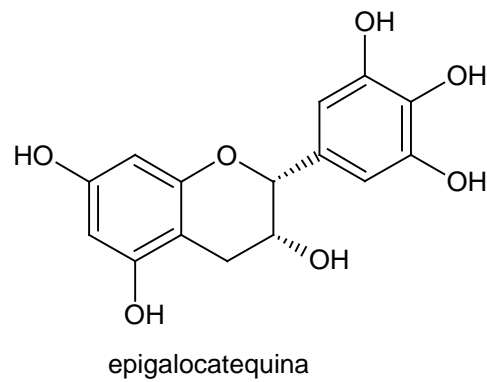
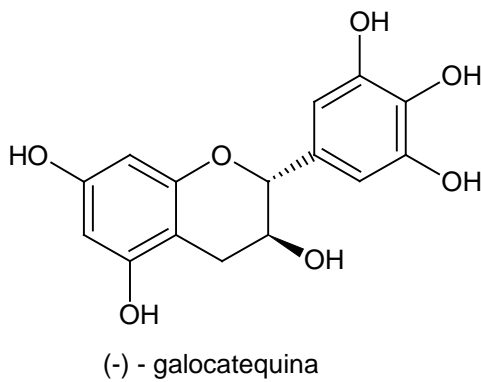
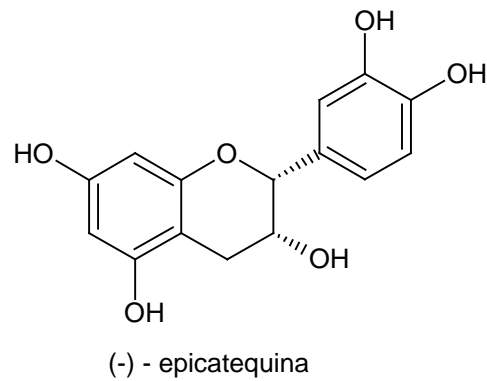
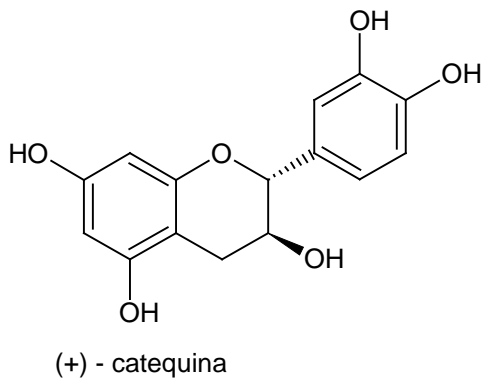
ANEXO A. ESTRUCTURAS BÁSICAS DE LOS POLIFENOLES PRESENTES EN CACAO

Estructura básica de los flavalones (flavan-3-oles)

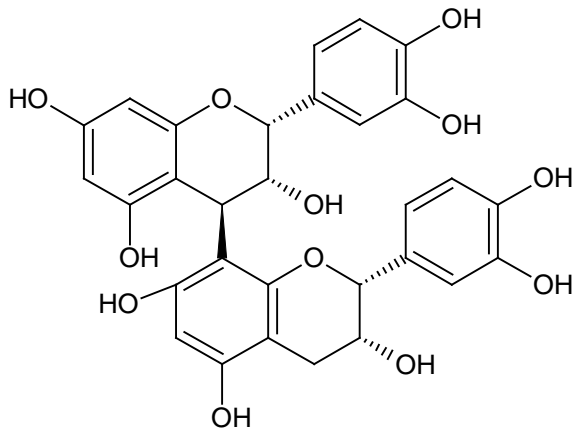


Flavanoles presentes en cacao

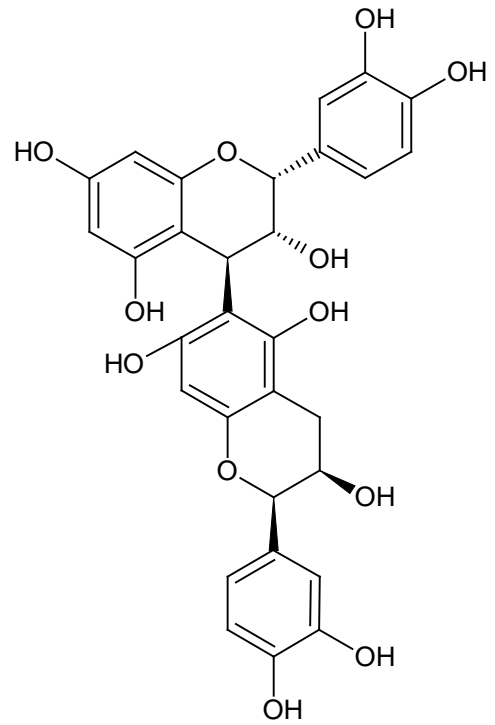
Estereoisómeros (3',4'-dihidroxilación del anillo B) con estructura catecol:



Oligómeros:

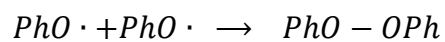
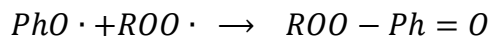
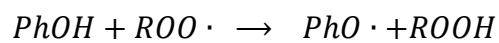


Procianidina B2

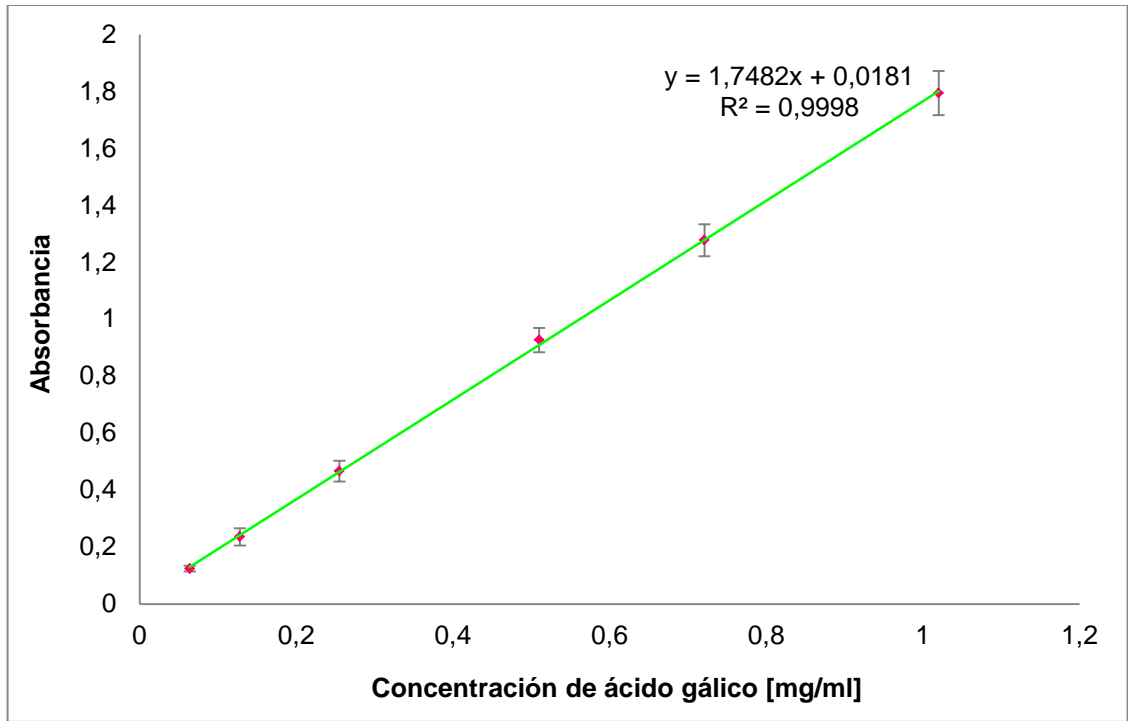


Procianidina B5

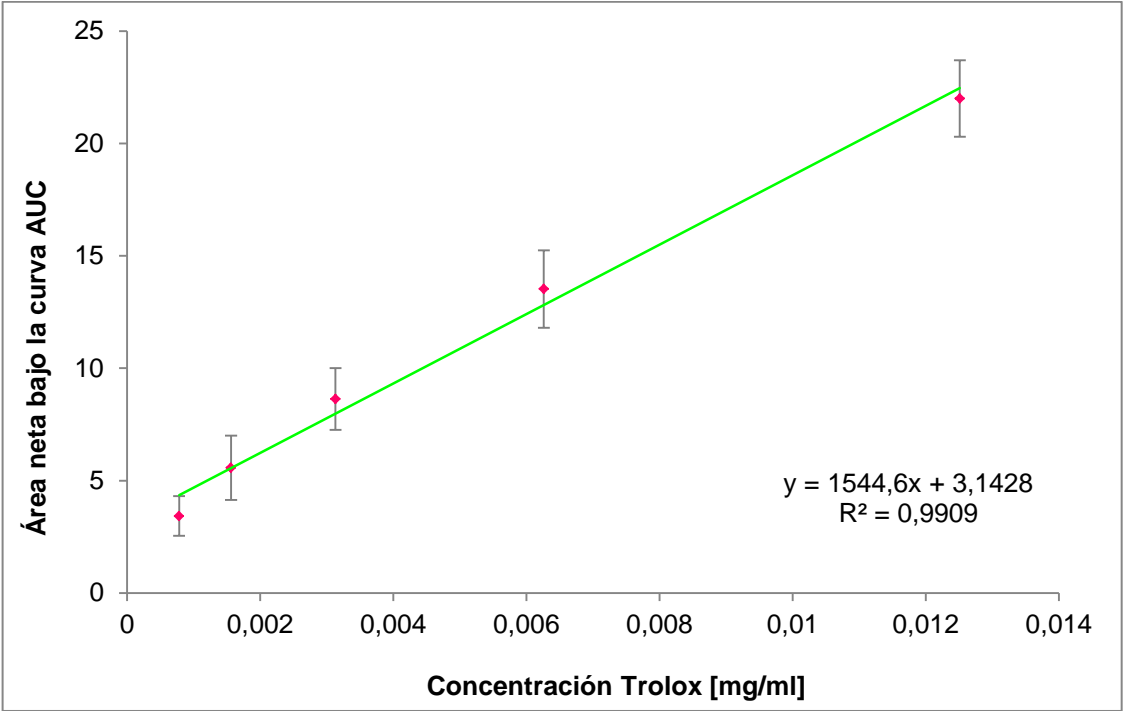
[Bors et al., en 1990](#). Establecieron la reacción de recombinación de una especie reactiva de oxígeno $ROO \cdot$ con el antioxidante fenólico $PhOH$; así:



ANEXO B. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU



ANEXO C. CURVA DE CALIBRACIÓN DE TROLOX® PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC

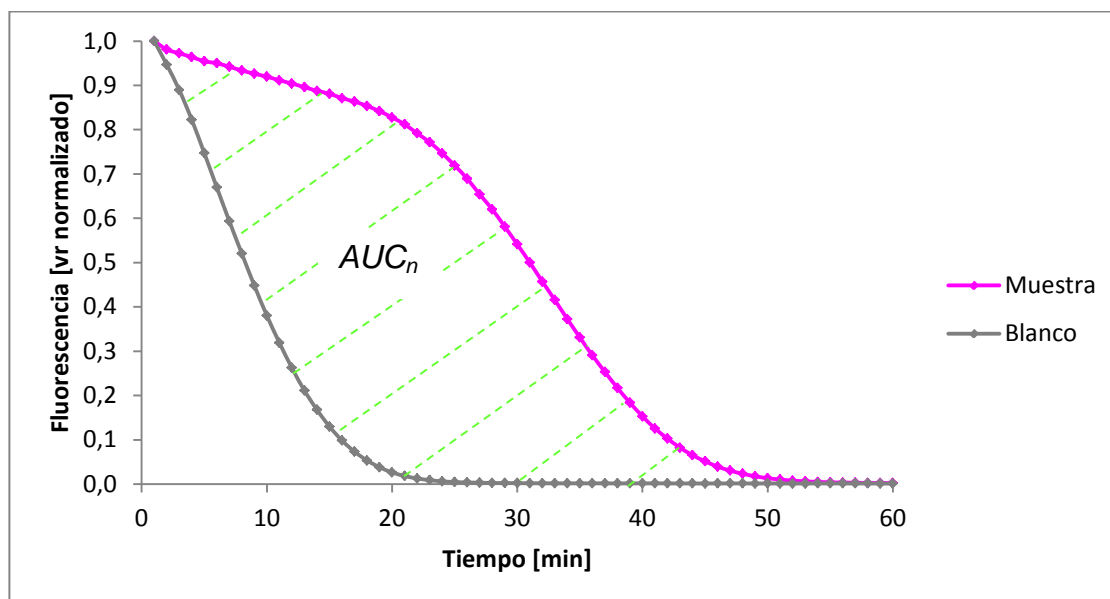


ANEXO D. PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC

Luego de realizar el procedimiento experimental descrito en el numeral **1.6.2** (Determinación de la capacidad antioxidante) se obtienen los valores de fluorescencia para cada una de las 3 mediciones, con los cuales se calcula el promedio y se halla el valor normalizado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Valor normalizado} = \text{Fluorescencia prom}_{t=0,1,2,\dots,n} \times \frac{\text{Fluorescencia prom}_{\text{blanco},t=0}}{\text{Fluorescencia prom}_{\text{muestra},t=0}}$$

Con el valor normalizado es posible construir la gráfica de fluorescencia con respecto al tiempo para cada una de las concentraciones de las muestras y el blanco de cada experimento (solución a la que no se añade ningún antioxidante). Y se puede calcular el área bajo la curva (AUC) tanto para la muestra como para el blanco utilizando el método Simpson 1/3.



El área bajo la curva neta se calcula entonces con la siguiente ecuación:

$$AUC_n = AUC_{muestra} - AUC_{blanco}$$

Con cada una de las concentraciones tanto de las muestras como de Trolox® y las áreas netas obtenidas anteriormente, es posible calcular la CA expresada en μmol Trolox-Equivalente/ g material seco ($\mu\text{mol TE/g ms}$) utilizando la ecuación mostrada a continuación:

$$CA = \frac{AUC_{n_{muestra}}}{AUC_{n_{Trolox}}} \times \frac{\text{molaridad Trolox}}{\text{concentración muestra}}$$