

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO DE  
POLIFENOLES Y METILXANTINAS EN MATERIALES DE CACAO  
COLOMBIANOS**

**LADY JOHANNA SIERRA PRADA**

**JERSON DUVAN PEÑARANDA HERRERA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2013**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO DE  
POLIFENOLES Y METILXANTINAS EN MATERIALES DE CACAO  
COLOMBIANOS**

**LADY JOHANNA SIERRA PRADA**

**JERSON DUVAN PEÑARANDA HERRERA**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial  
para optar por el título de Químico**

**Director: Janeth Aidé Perea Villamil, Química, Ph.D**

**Codirector: Tatiana Cadena Cala, Química, Magíster**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUIMICA**

**BUCARAMANGA**

**2013**

DEDICATORIA

*“A la memoria de mi padre, a mi madre y a mi hermana”*

*Duvan*

*“A mis padres Zoraya y Facundo, a mis hermanos Katerin y  
Fredy y a Faruck”*

*Lady*

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** quien nos ha bendecido tanto.

A nuestros **padres, hermanos y familiares**, quienes nos acompañaron y apoyaron durante esta etapa de nuestra vida.

A la **Dr. Janeth Aidé Perea Villamil** por su dirección y sus enseñanzas que enriquecieron nuestro desarrollo profesional.

A **Tatiana Cadena Cala** por el apoyo, dirección y acompañamiento en la realización de este proyecto, también por sus valiosas enseñanzas y consejos.

Al departamento administrativo de ciencia, tecnología e innovación **COLCIENCIAS** por el apoyo económico al proyecto.

Al departamento de investigación de **FEDECACAO** por su colaboración durante la ejecución del proyecto.

Al Nuestros compañeros del grupo de investigación en ciencia y tecnología de alimentos, **CICTA**, en especial a Luis Carlos Rodríguez y Arley Villamizar por el apoyo que nos dieron.

A todos nuestros **compañeros y amigos** por los momentos compartidos durante los años en la universidad.

*Duvan y Lady*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	21
<b>1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	23
1.1 BENEFICIO DEL GRANO DE CACAO	24
1.2 LA ENZIMA <i>POLIFENOL OXIDASA</i> Y SU ROL EN EL PROCESO DE BENEFICIO DEL CACAO	25
1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CACAO	26
1.4 POLIFENOLES Y METILXANTINAS EN EL CACAO	27
1.5 MEDICION DE POLIFENOLES TOTALES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y METILXANTINAS	33
1.5.1 Determinación de polifenoles totales	33
1.5.2 Determinación de la Actividad antioxidante mediante el método ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)	34
1.5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	35
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	37
2.1 MATERIALES Y REACTIVOS	37
2.1.1 Reactivos	37
2.1.2 Equipos	37
2.1.3 Recolección y tratamiento de muestras	37

2.2	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOL OXIDASA	39
2.3	MÉTODOS DE ANÁLISIS	40
2.3.1	<b>Determinación del contenido de humedad</b>	40
2.3.2	<b>Obtención de extractos</b>	40
2.3.3	<b>Análisis de polifenoles totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu</b>	41
2.3.4	<b>Análisis de la actividad antioxidante: Ensayo de la capacidad de absorción de oxígeno radical ORAC</b>	41
2.3.5	<b>Identificación y cuantificación de metilxantinas y flavonoides por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia/eficacia HPLC</b>	42
2.3.6	<b>Obtención de extractos liofilizados</b>	43
2.3.7	<b>Análisis de la actividad antioxidante (ORAC), de extractos liofilizados de ICS 39, té verde y patrones comerciales</b>	43
2.3.8	<b>Análisis estadístico</b>	44
3.	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	45
3.1	RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA	45
3.2	EVALUACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	47
3.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	51
3.4	EVALUACIÓN DE (-) EPICATEQUINA Y (±) CATEQUINA	54
3.5	EVALUACIÓN DE CAFEÍNA Y TEOBROMINA	57
3.5.1	<b>Relación Teobromina/Cafeína en semillas secas sin fermentar ..</b>	59
3.6	CORRELACIÓN DE VARIABLES EVALUADAS	62
3.6.1	<b>Análisis de correlaciones lineales</b>	63

<b>3.6.2</b>	<b>Análisis de componentes principales</b>	65
<b>3.6.3</b>	<b>Análisis de conglomerados</b>	67
<b>3.7</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE OXÍGENO RADICAL DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE ICS 39 RESPECTO A OTROS ANTIOXIDANTES COMERCIALES</b>	70
<b>3.8</b>	<b>EFECTO DEL BENEFICIO DEL GRANO DE ICS 39 SOBRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b>	73
	<b>CONCLUSIONES</b>	75
	<b>RECOMENDACIONES</b>	76
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	77
	<b>ANEXOS</b>	85

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Composición química del grano de cacao.	27
<b>Tabla 2.</b> Identificación, nombre y origen de materiales de cacao	38
<b>Tabla 3.</b> Contenido de polifenoles totales de las semillas de ICS 60 tratados con calentamiento a 95°C durante los tiempos cero ( $T_0$ ) y 10 minutos ( $T_2$ ).	46
<b>Tabla 4.</b> Contenido de polifenoles totales en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	48
<b>Tabla 5.</b> Polifenoles totales en muestras de semillas de cacao de diferentes orígenes.	50
<b>Tabla 6.</b> Actividad antioxidante en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	52
<b>Tabla 7.</b> Contenido de flavonoides en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	54
<b>Tabla 8.</b> Resultados del contenido de (-)-Epicatequina y ( $\pm$ )-Catequina en semillas de cacao de diferentes estudios.	56
<b>Tabla 9.</b> Contenido de metilxantinas en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	58
<b>Tabla 10.</b> Relación Teobromina/Cafeína para diferentes grupos genéticos de cacao.	60
<b>Tabla 11.</b> Variables relacionadas con mayor correlación positiva ( <b>a</b> ) y negativa ( <b>b</b> ).	64
<b>Tabla 12.</b> Matriz de componentes principales.	65
<b>Tabla 13.</b> Conformación de tres conglomerados según el algoritmo de Ward.	69
<b>Tabla 14.</b> Valores de área neta experimental de algunos patrones comerciales y de extractos liofilizados de Té verde e ICS 39.	71

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Frutos de cacao de 4 a 5 meses de edad, cortados longitudinalmente.	24
<b>Figura 2.</b> Estructura químicas de los flavonoides.	28
<b>Figura 3.</b> Estructuras químicas de los flavonoides más destacados.	29
<b>Figura 4.</b> Estructuras químicas de flavonoides en el grano de cacao.	30
<b>Figura 5.</b> Estructuras químicas de metilxantinas.	30
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de oxidación de la fluoresceína en presencia de AAPH.	35
<b>Figura 7.</b> Obtención de frutos sanos y frescos (a), formación de grupos de 100 g (b) y secado de las semillas a 50 °C durante 24 h (c).	39
<b>Figura 8.</b> Resultados de la inactivación de la enzima polifenol oxidasa en cuatro grupos de ICS 60.	45
<b>Figura 9.</b> Polvo de cacao de ICS 60 sin tratamiento T <sub>0</sub> y con tratamiento T <sub>2</sub> .	47
<b>Figura 10.</b> Diagrama de cajas para la variable polifenoles totales de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	49
<b>Figura 11.</b> Características morfológicas de tamaño y color para materiales tipo criollo, como FSV 41 y FSV 155.	50
<b>Figura 12.</b> Diagrama de cajas para la actividad antioxidante de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	53
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico de (-)-Epicatequina (a) y (±)-Catequina (b) de un extracto de semilla seca sin fermentar de ICS 39.	55
<b>Figura 14.</b> Diagrama de cajas para catequinas totales de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	56
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico de Teobromina (a) y Cafeína (b) de un extracto de semilla seca sin fermentar de ICS 39.	59
<b>Figura 16.</b> Diagrama de cajas para la relación Teobromina/Cafeína de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	61
<b>Figura 17.</b> Dendrograma con las ocho variables comprendidas en el estudio.	67

**Figura 18.** Dendrograma con las ocho variables de referencia y los 21 materiales de estudio. 68

**Figura 19.** Contenido de polifenoles totales (a) y capacidad antioxidante (b) en granos fermentados y sin fermentar de ICS 39. 74

## LISTA DE GRÁFICAS

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfica 1.</b> Relación entre el contenido de Cafeína y la razón Teobromina/Cafeína en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	62
<b>Gráfica 2.</b> Dispersión matricial de las variables de estudio.	63
<b>Gráfica 3.</b> Diagrama de Componentes Principales (ACP) para las variables contempladas en el estudio de semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.	66
<b>Gráfica 4.</b> Correlación de la actividad antioxidante según las pendientes de patrones y extractos liofilizados.	71
<b>Gráfica 5.</b> Señal de decaimiento de la fluoresceína con respecto al tiempo de reacción para los extractos y sustancias bajo estudio a 3100 [µg/L].	72

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO A.</b> Curva de calibración para la medición de polifenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu.	86
<b>ANEXO B.</b> Curva de calibración para la medición de la actividad antioxidante por el método de ORAC.	87
<b>ANEXO C.</b> Curvas de calibración de Teobromina, cafeína, (-)-epicatequina, (±)-catequina.	88
<b>ANEXO D.</b> Cromatogramas de extractos de semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao. Donde 1. Teobromina, 2. Cafeína, 3. Procianidina B2, 4. (-)-Epicatequina, 5. Procianidina B1 y 6. (±)-Catequina.	90
<b>ANEXO E.</b> Gráficas de correlación lineal de Pearson para los dúos de variables más significativos.	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Actividad antioxidante
<b>AAPH</b>	[2,2'-Azobis(2-amidinopropano)hidrocloruro]
<b>ACP</b>	Análisis de componentes principales
<b>AG</b>	Ácido gálico
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>°C</b>	Grado (s) Celsius
<b>(±)-C</b>	(±)-Catequina
<b>CD</b>	<i>CyclodextrinModified</i> (Ciclodextrina Modificada)
<b>CP</b>	Componente principal
<b>CICTA</b>	Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos
<b>EAG</b>	Equivalentes de Ácido gálico
<b>EC</b>	Equivalente de epicatequina
<b>(-)-EC</b>	Epicatequina
<b>Et al.</b>	Y otros
<b>Fig.</b>	Figura
<b>F-L</b>	Folin-Ciocalteu
<b>FL</b>	Fluoresceína [sal de disodio de 3',6'-dihidroxi-spiro (3H-isobenzofuran-1,9'-xanten)-3-ona]
<b>g</b>	Gramo
<b>HAT</b>	<i>Hydrogenatom transfer</i> (Transferencia de átomo de hidrogeno)
<b>HPLC</b>	<i>High Performance LiquidChromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>MEKC</b>	<i>MicellarElectrokineticChromatography</i> (cromatografía electrocinética micelar)
<b>min</b>	Minuto

<b>mL</b>	Mililitro
<b>ms</b>	Muestra seca
<b>mtra</b>	Muestra
<b>ORAC</b>	<i>Oxygen Radical AbsorbanceCapacity (Capacidad de absorción del oxígeno radical)</i>
<b>p.s.l.g</b>	Peso seco libre de grasa
<b>PPO</b>	Polifenol oxidasa
<b>PT</b>	Polifenoles totales
<b>RP</b>	<i>Reverse Phase</i> (Fase Reversa)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TE</b>	<i>Trolox equivalents</i> (equivalentes Trolox)
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta Visible

## RESUMEN

### TÍTULO:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO DE POLIFENOLES Y METILXANTINAS EN MATERIALES DE CACAO COLOMBIANOS<sup>1</sup>

**AUTORES:** Peñaranda H. Jerson D<sup>2</sup>; Sierra P. Lady J<sup>2</sup>.

**PALABRAS CLAVES:** *Theobroma cacao* L, polifenoles, actividad antioxidante.

### DESCRIPCIÓN:

Durante los últimos años las semillas de cacao se han convertido en un producto importante en el mercado de los alimentos y productos funcionales, debido a su elevado contenido de sustancias bioactivas como las metilxantinas y de antioxidantes como los polifenoles. Teniendo en cuenta que en Colombia existe una amplia diversidad genética de materiales de cacao de los cuales se desconoce el contenido de sustancias funcionales y antioxidantes, surge la necesidad de estudiar los materiales que más se cultivan en el país, con el fin de establecer diferencias entre ellos y encontrar aquellos con mayor potencial en el mercado de los productos funcionales.

Según lo anterior, en este trabajo se evaluó en 21 materiales de cacao Colombiano, el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, la actividad antioxidante por el método de absorción de radicales de oxígeno ORAC, el contenido de los flavonoides (-)-epicatequina y (±)-catequina, así como el contenido de las metilxantinas teobromina y cafeína por cromatografía líquida de alta eficacia HPLC.

Todos los materiales evaluados presentaron diferencias significativas para cada una de las variables mencionadas; lo que facilitó la formación de grupos homogéneos con características similares. Los materiales CCN 51, ICS 95, FSV 25, ICS 1, EET 8, EET 96, ICS 6, ICS 39, e ICS 60 son los más destacados de la investigación por contener los mayores valores para las variables contempladas.

Por otra parte el clon ICS 39 presentó el mayor contenido de polifenoles totales y la mayor capacidad antioxidante superando inclusive al extracto de té verde y a otros antioxidantes comerciales, lo que permite seleccionarlo como material de interés comercial en la elaboración de productos nutricionales. En conclusión, los resultados encontrados demuestran que Colombia cuenta con materiales de excelente calidad como el ICS 39 y FSV 25, para la comercialización y desarrollo de productos funcionales.

<sup>1</sup> Trabajo de grado

<sup>2</sup> Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director, Janeth Aidé Perea Villamil; Co-director: Tatiana Cadena Cala.

## ABSTRACT

### TITLE:

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY, POLYPHENOLS CONTENT AND METHYLXANTINES IN COLOMBIAN COCOA MATERIALS.<sup>1</sup>

**AUTHORS:** Peñaranda H. Jerson D<sup>2</sup>; Sierra P. Lady J<sup>2</sup>.

**KEYWORDS:** *Theobroma cacao L.*, polyphenols, antioxidant activity.

### DESCRIPTION:

In recent years, cocoa beans have become in a product of great importance in the growing market for functional foods and products, due to its high content of bioactive substances such as methylxanthines and antioxidants like polyphenols. Given that Colombia has a wide genetic variety of cocoa materials which content of functional substances and antioxidants is unknown, there is a need to study materials that were grown in the country, in order to differentiate between them and find those with the greatest potential in the market for functional products.

As above, in this work was evaluated in 21 Colombian cocoa materials, total polyphenol content by Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity by the method of oxygen radical absorbance capacity ORAC, the flavonoids content (-)-epicatechin and (±)-catechin, as well as the content of methylxanthines theobromine and caffeine by high performance liquid chromatography HPLC.

All tested materials showed significant differences for each of the variables mentioned above, which facilitated the formation of homogeneous groups with similar characteristics. The materials CCN 51, ICS 95, FSV 25, ICS 1, TSE 8, TSE 96, ICS 6, ICS 39 and ICS 60 are the most outstanding in the research to contain the highest values for the variables considered in the study.

Moreover ICS 39 had the highest total polyphenol content and antioxidant capacity increased even surpassing green tea extract and other commercial antioxidants, allowing select it as a material of commercial interest in the development of nutritional products. In conclusion, the results show that Colombia has high quality materials as the ICS 39 and FSV 25, for marketing and development of functional products.

<sup>1</sup>Collegue thesis

<sup>2</sup>Universidad Industrial de Santander, Faculty of science, Department of Chemistry. Director, Janeth Aidé Perea Villamil; Co-director, Tatiana Cadena Cala.

## INTRODUCCIÓN

El cacao ha sido por tradición uno de los principales productos agrícolas de Colombia y de Santander, debido a que su cultivo se ve favorecido por las condiciones agroecológicas para su producción y comercialización. Según los últimos datos reportados por la ICCO (International Cocoa Organization), para el 2012 Colombia alcanzó una producción anual de 48.000 toneladas de Cacao, ocupando el quinto lugar en América, después de Brasil, Ecuador, República Dominicana y Perú (ICCO, 2012).

El cultivo de cacao es importante porque este grano es una materia prima fundamental para las industrias productoras de chocolate de mesa, chocolatería, confitería, cosméticos y productos farmacéuticos. Adicionalmente, en los últimos años las semillas de cacao se han convertido en un producto de gran importancia en el creciente mercado de los alimentos y productos funcionales, debido a su elevado contenido de sustancias bioactivas como las metilxantinas y de antioxidantes como los polifenoles (Wollgast&Anklam, 2000; Hii *et al.*, 2009; Afoakwa, 2010).

Pese a la conocida funcionalidad de las metilxantinas y polifenoles contenidos en las semillas de cacao, se ha encontrado que la concentración de estas sustancias varía con la región de origen, material genético y condiciones de cosecha (Carrillo *et al.*, 2013; Niemenak *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que en Colombia existe una amplia diversidad genética de materiales de cacao de los cuales no se conoce el contenido de sustancias funcionales y antioxidantes, surgió la necesidad de estudiar los materiales que más se cultivan en el país.

Por tanto la caracterización funcional de los materiales más comercializados en el país, partiendo de semillas de cacao sin fermentar, servirá como herramienta para identificar y seleccionar los materiales más ricos en sustancias bioactivas. Este

conocimiento permitirá a futuro, que los agricultores conozcan el potencial funcional del cacao cultivado y así puedan competir en mercados que ofrezcan un mejor precio para el grano.

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó para muestras sin fermentar de 21 clones de cacao, el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método de absorción de radicales libres de oxígeno ORAC, así como el contenido de flavonoides (epicatequina y catequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína) medidos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Los resultados obtenidos a partir de la realización de este proyecto, permitieron establecer diferencias significativas entre los materiales, además de facilitar la conformación de grupos homogéneos con contenidos similares de sustancias funcionales y actividad antioxidante. Así mismo se destaca al ICS 39 como material con amplio potencial en el mercado de los productos funcionales, porque presenta el mayor contenido de polifenoles totales y la mayor actividad antioxidante, superando incluso a otros alimentos como el té verde y sustancias con conocida actividad antioxidante.

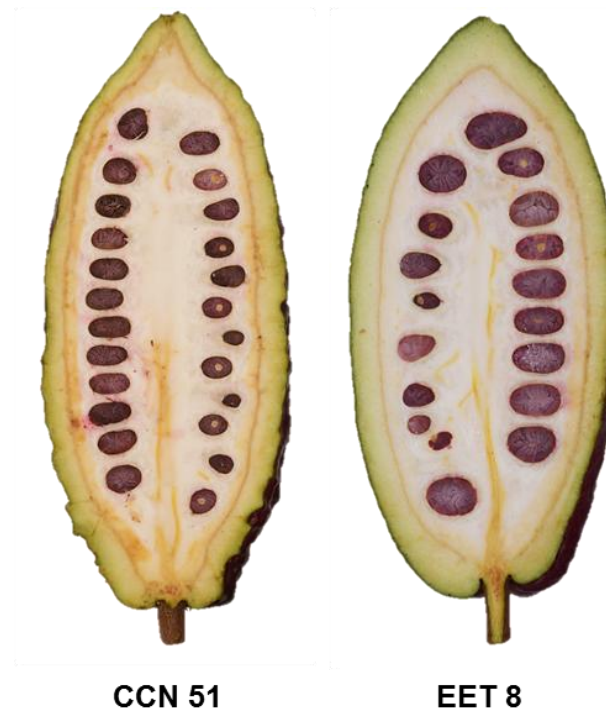
Los resultados parciales del trabajo realizado fueron presentados en el Seminario Internacional de Cacao y Chocolate “*Nuevos retos en calidad*” (2013).

La ejecución de este trabajo formó parte del macro-proyecto “Caracterización fisicoquímica, funcional y organoléptica, de clones de cacao introducidos y regionales promisorios”, financiado por Colciencias y desarrollado en conjunto por el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos-CICTA de la Universidad Industrial de Santander y el departamento de Investigación de la Federación Nacional de Cacaoteros-FEDECACAO.

## 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El grano o semilla de cacao se obtiene de la planta de cacao (*Theobroma cacao* L), perteneciente a la familia *Sterculiaceae*. Los árboles se encuentran en climas cálidos y húmedos en las zonas alrededor de 20° de latitud norte y al sur del Ecuador. En general, las semillas del *Theobroma cacao* L son conocidas en cuatro variedades principales: *Criollo*, que constituye el 5% de la producción mundial; el más común *Forastero*, con granos más pequeños, planos y violetas; el *Nacional*, originario de Ecuador, de fino aroma y sabor; y la cuarta variedad llamado *Trinitario*, es esencialmente un híbrido entre Criollo y Forastero, que se caracteriza por su resistencia a enfermedades y por ser considerado como un grano de sabor (Afoakwa, 2010; Onwulata, 2005; Wollgast&Anklam, 2000). En Colombia las principales variedades cultivadas son los híbridos entre Forastero/amazónico y los clones trinitarios, mientras que las principales regiones de cultivo son: los Santanderes, Arauca y el pacífico (Carrillo *et al.*, 2013).

Las mazorcas de cacao son el fruto del árbol *Theobroma cacao* L, tienen un tamaño que se encuentra en el intervalo 15 - 21 centímetros y sus formas básicas son de angoleta, cundeamor, amelonado y calabacillo (Perea *et al.*, 2013). Dentro del fruto están los granos de cacao cubiertos por una superficie blanca y viscosa denominada mucílago. El grano tiene forma ovalada, un tamaño aproximado de 1,5-3 centímetros de altura y entre 0,5 - 1 centímetros de ancho, pesa entre 1,3 y 1,7 gramos y está cubierto por una capa fina exterior denominada cascarilla (Perea *et al.*, 2013; Afoakwa, 2010; Onwulata, 2005; Wollgast&Anklam, 2000). En la **Figura 1** se presentan algunos frutos o mazorcas de cacao abiertas y en su interior se observan las semillas recubiertas por el mucílago.



Fuente. FEDECACAO 2013.

**Figura 1.** Frutos de cacao de 4 a 5 meses de edad, cortados longitudinalmente.

### 1.1 BENEFICIO DEL GRANO DE CACAO

El proceso de beneficio del cacao, comprende todo el manejo postcosecha que se le da a los frutos y semillas, y es fundamental para obtener un grano de buena calidad. Durante este proceso se realiza la transformación biológica de semillas de cacao y comprende las etapas de cosecha, fermentación y secado (Afoakwa, 2010). *La cosecha* involucra la separación de los frutos o mazorcas de los árboles. Dentro de las mazorcas se encuentran los granos, semillas o almendras de cacao, las cuales se encuentran cubiertas de una pulpa blanca conocida como mucílago. Las semillas junto con el mucílago se remueven de las mazorcas y así finaliza la cosecha.

La *fermentación* que comprende entre 3 y 6 días, dependiendo de la variedad genética y se da en dos etapas, una anaeróbica y otra aeróbica; es una etapa clave de procesamiento, que provoca la muerte de la semilla y facilita la eliminación del mucílago. A lo largo de esta etapa se desarrollan el sabor y aroma del chocolate, y se presenta una reducción significativa en la astringencia y sabor amargo del grano. Durante la fermentación también ocurre la pérdida más significativa de polifenoles solubles (15-25%), los cuales se eliminan mediante los líquidos de drenado o se oxidan por acción de la polifenol oxidasa (Wollgast&Anklam, 2000; Misnawiet *al.*, 2002).

Finalmente el *secado*, es un proceso que tarda entre 4 y 8 días; y tiene como finalidad disminuir la humedad interna de los granos y terminar de desarrollar los precursores del sabor y aroma. Esta etapa generalmente se realiza al sol, pero también se puede utilizar equipos de secado (Afoakwa, 2010; Onwulata 2005). Durante el secado también juegan un rol muy importante la oxidación no enzimática de los polifenoles, que ayuda a disminuir la astringencia y el sabor amargo del chocolate (Wollgast&Anklam, 2000; Nazaruddin *et al.*, 2006).

## **1.2 LA ENZIMA *POLIFENOL OXIDASA* Y SU ROL EN EL PROCESO DE BENEFICIO DEL CACAO**

La *polifenol oxidasa* (PPO) es una enzima involucrada en la oxidación de los polifenoles presentes en diferentes plantas y frutos. Cuando las células de los tejidos vegetales se encuentran sanas e intactas, la PPO y los sustratos (fenoles) se encuentran separados y ubicados en los cloroplastos y vacuolas respectivamente; pero cuando ocurre cualquier alteración, los fenoles y la PPO se juntan e inician las reacciones de oxidación.

En los granos de cacao, la activación de la PPO es ocasionada por el incremento en la temperatura y por el cambio en las condiciones de pH que ocurren durante los procesos de fermentación y secado. Como consecuencia de la activación de la enzima, en presencia de oxígeno, ocurre la oxidación de los flavonoides, disminuyendo así la astringencia y el sabor amargo del cacao (Misnawiet *al.*, 2002).

Pese a que la calidad sensorial del cacao aumenta después de los procesos de oxidación que ocurren en el beneficio, el contenido de polifenoles disminuye, afectando significativamente el valor funcional del cacao. Con el fin de obtener semillas de cacao con un elevado contenido de polifenoles y evitar los procesos de oxidación, Tomas Barberanet *al* (2007), propusieron la inactivación de la PPO en las semillas frescas, mediante un tratamiento térmico de escaldado. El grano obtenido mediante este tratamiento, aunque es amargo y astringente, se puede utilizar como materia prima en la industria farmacéutica y en la producción de suplementos dietarios y alimentos funcionales (Tomas-Barbernet *al.*, 2007; Misnawiet *al.*, 2002; Wollgast&Anklam, 2000).

### 1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CACAO

El cacao es fuente de macronutrientes como proteína, grasa y fibra; también de micronutrientes: potasio magnesio y fosforo.). El grano de cacao contiene también sustancias con elevada actividad antioxidante como los polifenoles y alcaloides naturales como la teobromina y la cafeína, que también se consideran como sustancias bioactivas (Tomas-Barbernet *al.*, 2007). En la **Tabla 1** se encuentra un resumen de la composición química del grano según lo reportado por varios autores que han evaluado materiales de cacao en diferentes regiones geográficas. (Perea *et al.*, 2011; Bertazzoet *al.*, 2011; Afoakwa, 2010; Hiiet *al.*, 2009).

**Tabla 1.** Composición química del grano de cacao.

<b>Componente</b>	<b>Composición</b>
<b>Macronutrientes</b>	
Grasa	49-56 %
Proteína	11,8-15,7 %
Fibra	1,5-4.1 %
<b>Micronutrientes</b>	
Potasio	700-1000 ppm
Magnesio	200-300 ppm
Fósforo	300-450 ppm.
<b>Bioactivos y funcionales</b>	
Polifenoles	5,8 %
Alcaloides	2-4 %

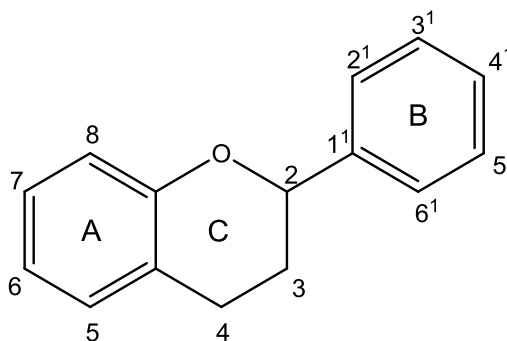
Fuente. Perea *et al.*, 2011; Bertazzo *et al.*, 2011; Afoakwa, 2010; Hii *et al.*, 2009.

#### **1.4 POLIFENOLES Y METILXANTINAS EN EL CACAO**

Los polifenoles se dividen en diez clases diferentes dependiendo de su estructura básica, estas clases son: fenoles simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos Hidroxiaminicos, fenilpropanos, cumarinas e isocumarinas, antraquinonas y los flavonoides (Wollgast&Anklam, 2000).

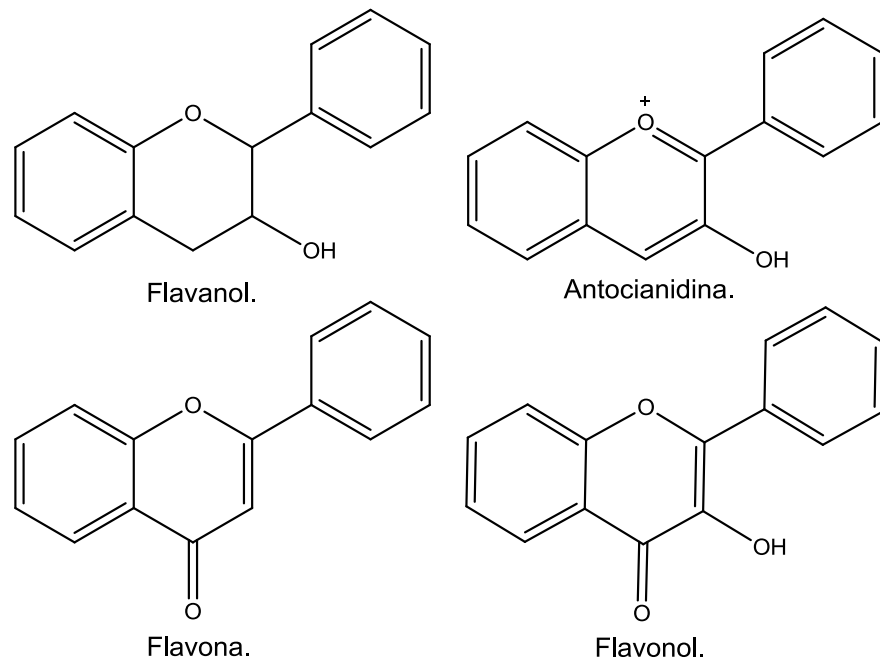
Los flavonoides constituyen el grupo más importante de los polifenoles y se pueden dividir en 13 clases con más de 5000 compuestos descritos para el año 1990 (Wollgast&Anklam, 2000). Se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, es decir, presentan un esqueleto carbonado  $C_6-C_3-C_6$  y están compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano (**Figura 2**).

Los flavonoides se encuentran hidroxilados en las posiciones 3, 5, 7, 3<sup>1</sup>, 4<sup>1</sup>, 5<sup>1</sup>. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina el tipo de flavonoide (Vermerriset *al.*, 2008; Borcherset *al.*, 2000). Dentro del grupo de esta gran familia, los más destacados, por su interés farmacológico, son las flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianidinas, catequinas y sus correspondientes glucósidos (**Figura 3**) (Wollgast&Anklam, 2000; Vermerris&Nicholson,2008).



**Figura 2.** Estructura químicas de los flavonoides.

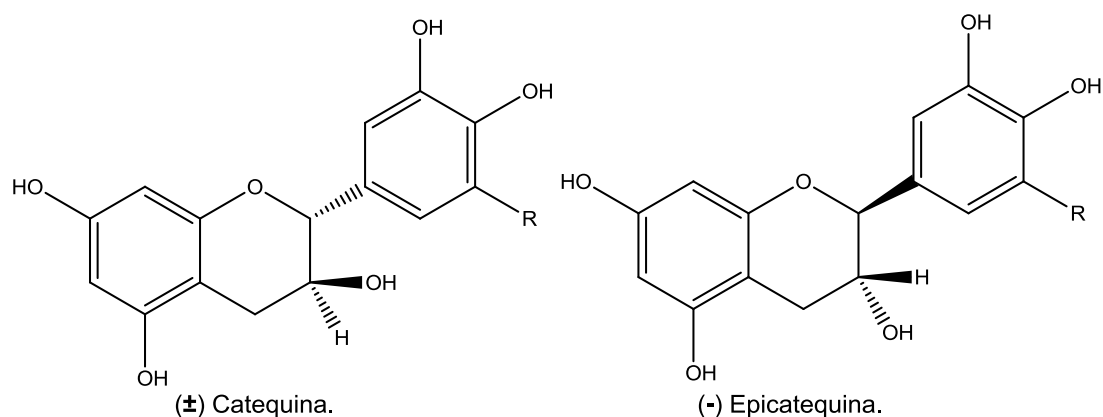
La acción antioxidante de los compuestos fenólicos resulta de sus propiedades quelantes para formar complejos con metales di- o trivalentes y de la capacidad secuestradora de radicales libres. Sus características antioxidantes, se deben a que estabilizan las especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo; esto se debe a la presencia de grupos hidroxilo unidos a un anillo bencénico, que facilitan, además, la deslocalización electrónica, porque disminuyen la energía y la reactividad del nuevo radical formado (Wollgast&Anklam, 2000; Vermerriset *al.*,2008).



**Figura 3.** Estructuras químicas de los flavonoides más destacados.

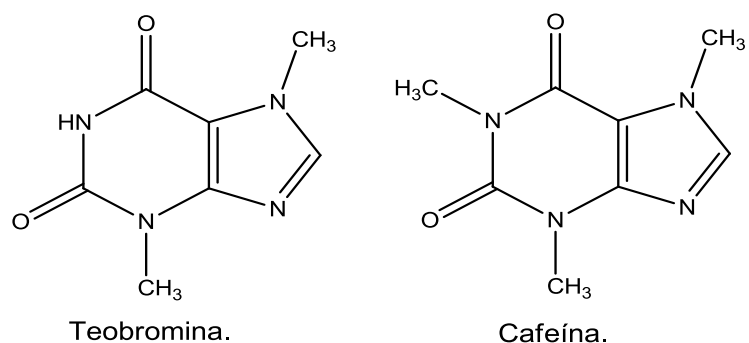
Alimentos como el té verde y el vino han sido ampliamente estudiados en décadas anteriores en cuanto a su contenido de polifenoles; sin embargo en los últimos años el estudio de las sustancias funcionales presentes en el cacao también ha despertado gran interés entre investigadores de todo el mundo.

Los principales polifenoles presentes en el cacao son antocianinas y procianidinas. Dentro de los flavonoides encontrados en los granos de cacao se pueden distinguir tres grupos: las catequinas (37%), las antocianinas (4%), y las proantocianidinas (58%). De este grupo de compuestos, la epicatequina se encuentra en una concentración de 25 mg/g de muestra y sus polimeros clasificados como procianidinas con una concentración de 9 mg/g, son los que se encuentran en mayor proporción en el grano (Wollgast & Anklam, 2000; Hiie *et al.*, 2009; Tomas-Barbernet *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Estructuras químicas de flavonoides en el grano de cacao.

Otros de los compuestos considerados bioactivos y que se encuentran en el cacao son los metilxantinas, de estas sustancias, la teobromina es la que se encuentra en mayor proporción con concentraciones aproximadas de 18mg/g de muestra, seguida por la cafeína con 4.5mg/g (Brunetto *et al.*, 2007; Tomas-Barbernet *et al.*, 2007). Estas sustancias también son las responsables de importantes características en el sabor y aroma del cacao (Brunetto *et al.*, 2007) y al igual que los polifenoles, han sido objeto de estudio en alimentos derivados del cacao como: licor de cacao, chocolate amargo, cocoa, entre otros, debido a sus propiedades funcionales (Belscaket *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Estructuras químicas de metilxantinas.

**1.4.1 Efectos sobre la salud de los flavonoides y las metilxantinas.** Los polifenoles han despertado atención debido a sus características antioxidantes y amplios beneficios para la salud humana como lo son las propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, vasodilatorias, y antimicrobianas. Estos compuestos también podrían reducir el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer debido a que eliminan las especies reactivas de oxígeno de tipo radical libre (Martin *et al.*, 2013; Corcuera *et al.*, 2012; Zomeret *al.*, 2012; Quiñones *et al.*, 2011).

También los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los flavonoides del cacao pueden dar lugar a la reducción de estrés oxidativo y a la disminución de la oxidación de los lípidos plasmáticos (colesterol LDL). Los flavonoides pueden aumentar los niveles de óxido nítrico (NO) en células endoteliales, favoreciendo así la vasodilatación (ensanchamiento de los vasos sanguíneos), y mejorando la función endotelial (Latif R, 2013; Buitrago *et al.*, 2011; Corti *et al.*, 2019; Oleagaet *al.*, 2012).

Por su parte las metilxantinas son sustancias estimulantes del sistema nervioso central y conllevan algunas acciones farmacológicas de interés terapéutico, tales como la relajación del músculo liso (primariamente bronquios), la estimulación del músculo cardíaco y el efecto diurético en los riñones (Belscak *et al.*, 2009).

**1.4.2 Efecto de las condiciones de beneficio y material genético sobre el contenido de polifenoles y metilxantinas.** La genética o variedad del grano de cacao, la región de origen y el proceso de beneficio, son algunas de las variables que más influyen en la concentración de polifenoles y metilxantinas en los granos (Azizahet *al.*, 2007; Tomas-Barbernet *al.*, 2007; Niemenaket *al.*, 2006). Diferentes investigaciones han demostrado que el mayor contenido de polifenoles se encuentra en los granos de cacao sin fermentar, esto debido a que durante el proceso de fermentación y secado se puede perder hasta el 50% de los

polifenoles por la acción de la enzima polifenol oxidasa (Misnawiet *al.*, 2002; Wollgast&Anklam, 2000; Tomas-Barbernet *al.*, 2007).

Una investigación realizada por la multinacional Natraceutical (Tomas-Barbernet *al.*, 2007), reportó diferencias significativas en el contenido total de polifenoles de muestras de cacao sin fermentar de diferentes orígenes. En dicho estudio se evaluaron muestras provenientes de Costa de Marfil, Colombia, Guinea Ecuatorial, Ecuador, Venezuela, Perú y República Dominicana, entre los que se encontraban materiales forasteros, amazónicos, híbridos, trinitarios y criollos. En el caso del cacao Amazónico Colombiano, los autores reportaron un contenido de polifenoles totales de 81.4 mg/g de muestra. El cacao con mayor contenido de polifenoles fue un forastero de Costa de Marfil (81.5 mg/g de muestra), mientras que el menor contenido se encontró en el cacao Criollo de Rep. Dominicana con un total de 40 mg/g de muestra.

Además del material genético y las condiciones de beneficio, otras variables que también influyen en el contenido de polifenoles y metilxantinas de las semillas de cacao son las condiciones de cultivo, entre ellas la temperatura, intensidad de luz, utilización de fertilizantes, altitud de las plantaciones (posición geográfica) entre otras (Carrillo *et al.*, 2013; Niemenaket *al.*, 2007). Una investigación realizada recientemente en Colombia (Carrillo *et al.*, 2013), estudió la influencia del área geográfica del cultivo sobre el contenido de polifenoles y metilxantinas, evaluando muestras de regiones con variabilidad climática y edafológica; entre ellas el Pacífico, el Orinoco y la zona Andina. Los autores reportaron una variación del contenido de polifenoles totales en granos sin fermentar entre 70.1 mg/g - 44.9 mg/g de muestra. También se encontraron variaciones en teobromina y cafeína con rangos entre 7.06-9,68 mg/g y 0,72-1,88 mg/g respectivamente.

En otros países tropicales donde se cultiva cacao como Camerún, se han adelantado investigaciones sobre el efecto de la variabilidad genética del grano de cacao sobre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante

(Niemenak *et al.*, 2007), encontrándose que aunque no hay diferencias cualitativas en los flavonoides y metilxantinas del grano, si existen diferencias cuantitativas entre materiales. En el caso de Colombia, pese a que se cuenta con una amplia variedad de materiales de cacao, aún no han realizado estudios sobre las características funcionales de los mismos.

## **1.5 MEDICIÓN DE POLIFENOLES TOTALES, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y METILXANTINAS**

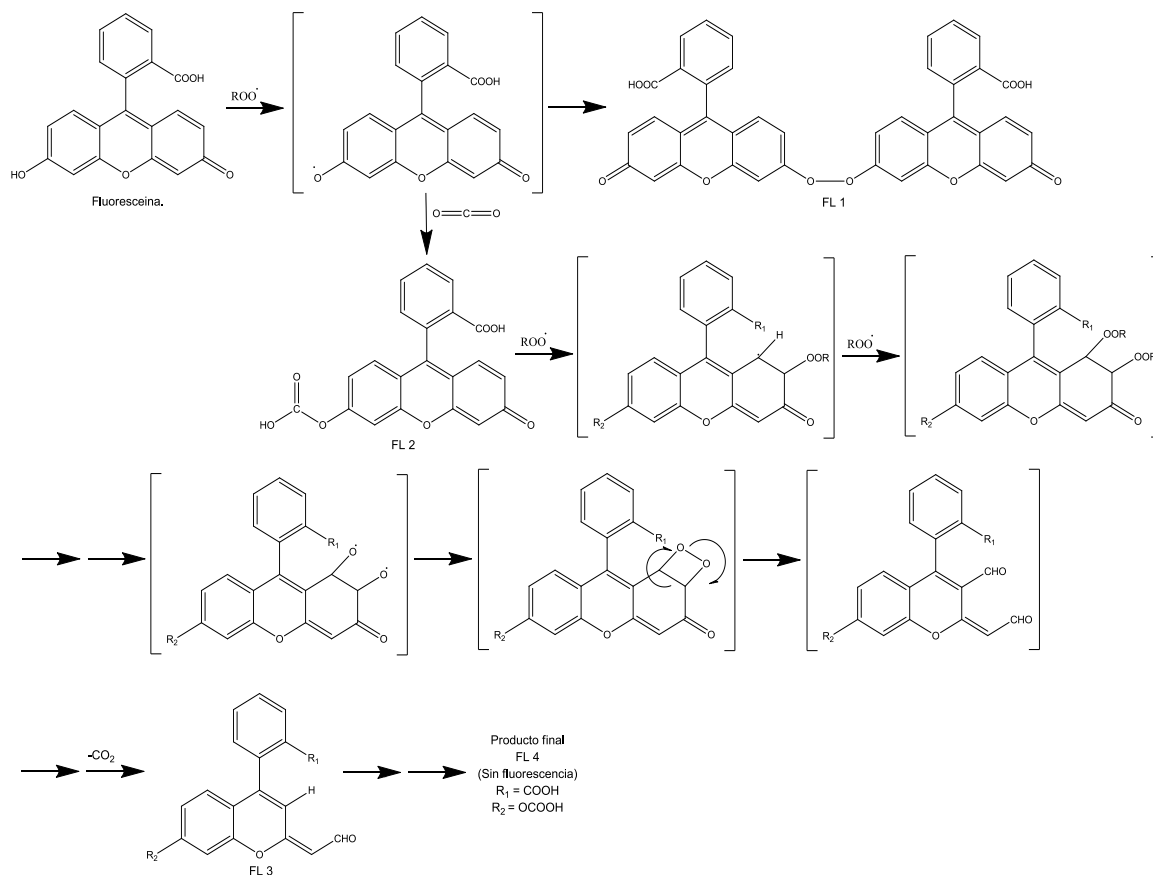
La determinación cuantitativa de los polifenoles en el cacao se realiza mediante el método de Folin-ciocalteu, la cuantificación específica de (-)-epicatequina y (+)-catequina, así como de metilxantinas se realiza por HPLC. Para evaluar la actividad antioxidante en semillas de cacao se pueden realizar diferentes métodos como ABTS, FRAP, DDPH y más recientemente el método ORAC. Este último método es el más utilizado para determinar la actividad antioxidante de muestras vegetales.

**1.5.1 Determinación de polifenoles totales.** El método de Folin-Ciocalteu mediante el cual se determinan los polifenoles totales, antioxidantes y otros sustratos de oxidación (Singleton *et al.*, 1999) es una técnica sencilla y precisa, sin embargo la reacción debe hacerse a un pH básico específico. Los parámetros necesarios para la obtención de datos reales como el tiempo y la temperatura de reacción, la longitud de onda y el uso del ácido gálico como patrón estándar fueron desarrollados por Singleton y Rossi (1965). El uso del ácido gálico se ha cambiado en algunas investigaciones por el uso de sustancias similares como: ácido tanínico, ácido vainillínico, ácido clorogénico, ácido felúrico, (-)-epicatequina y (+)-catequina (Prior *et al.*, 2005).

**1.5.2 Determinación de la actividad antioxidante mediante el método ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno).** El mecanismo de reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Para ello, se emplea un indicador que genera el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). En presencia de un compuesto antioxidante, el radical forma un enlace con un átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante y se origina un hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) y un radical antioxidante estable (Huanget *al.*, 2002; Ouet *al.*, 2001). Este ensayo es un ejemplo del rompimiento de reacciones en cadena por transferencia de un átomo de hidrógeno proveniente de un compuesto antioxidante y sirve para medir la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (fluoresceína) (Ouet *al.*, 2001).

La Fluoresceína reacciona con el AAPH (2,2-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro) el cual es un azoderivado generador de radicales libres. El AAPH produce radicales peroxilo por calentamiento, que dañan la molécula fluorescente, la cual se oxida para neutralizar los radicales, resultando en pérdida de su fluorescencia. En la **Figura 6** se puede observar el mecanismo propuesto para la oxidación de la fluoresceína en presencia de AAPH (Ouet *al.*, 2001). Los antioxidantes protegen la molécula fluorescente de la degeneración oxidativa y el grado de protección se cuantifica usando un espectrofluorímetro.

La velocidad en la disminución de la fluorescencia puede reducirse en presencia de un antioxidante, ya que este compite con el compuesto fluorescente para estabilizar el radical. La capacidad antioxidante se determina por la disminución en la fluorescencia y la cantidad de producto formado en función del tiempo. La protección del antioxidante se mide a partir del área bajo la curva de la muestra y del blanco de reacción. La diferencia de estos valores se extrapola en la curva de calibración del Trolox®. Esta metodología puede ser adaptada para la detección de antioxidantes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (Wuet *al.*, 2004; Huanget *al.*, 2002; Ouet *al.*, 2001).



Fuente: Ouet *et al.*, 2001.

**Figura 6.** Mecanismo de oxidación de la fluoresceína en presencia de AAPH.

**1.5.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia/eficacia (HPLC).** Es la técnica comúnmente utilizada para el análisis de compuestos fenólicos en diferentes matrices. En general, para el análisis de flavonoides y metilxantinas se ha empleado principalmente la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), es decir, cuando la fase estacionaria posee menor polaridad que la fase móvil (Merken Y Beecher, 2000; Schinella *et al.*, 2010). Los gradientes de elución se realizan con sistemas binarios de disolventes, tales como: soluciones acuosas acidificadas con ácidos acético, trifluoroacético, o fórmico, o con buffer, acetato o formiato en agua y con metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos (Merken Y Beecher, 2000; Cienfuegos-Jovellanos *et al.* 2009).

En cuanto a los sistemas de detección, cuatro, de los más empleados, son UV-Vis, detector con arreglo de diodos (DAD), fluorescencia y MS. Todos los compuestos fenólicos contienen, por lo menos, un anillo aromático; en consecuencia, absorben luz ultravioleta (Merken Y Beecher, 2000). Para el caso de los flavonoides, el primer máximo se encuentra entre 240-285 nm, debido al anillo A y, el segundo máximo, se presenta en el rango de 300-550 nm, debido al anillo C, las metilxantinas tienen sus máximos de absorción en un intervalo de 265-275 nm aproximadamente (Merken Y Beecher, 2000, Schinella *et al*, 2010).

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

**2.1.1 Reactivos.** Para el desarrollo del proyecto se emplearon: agua, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico, todos grado HPLC. También se emplearon los reactivos: hexano, etanol, reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, carbonato de sodio, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Fluoresceína (FL), AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) hidrocloreuro), buffer de fosfato (pH = 7,4). Las sustancias patrón de (-)-Epicatequina, (±)-Catequina, Teobromina y Cafeína fueron *Sigma Aldrich*, todas grado analítico.

**2.1.2 Equipos.** Los equipos de laboratorio utilizados fueron: placa de calentamiento MR Hei-Tec marca Heidolph, balanza analítica AB204-S marca Mettler-Toledo, ultracentrífuga J2-21 marca Beckman, baño ultrasónico LC-30H marca Ultrasonic, estufa marca Binder, rotaevaporador marca Buchi, agitador vibrador para tubos de ensayo marca SchottGerate, liofilizador marca Labconco, ultracongelador marca Esco, espectrofotómetro Genesys 20 marca ThermoSpectronic, espectrofluorímetro FluoroskanAscent marca ThermoSpectronic, y un sistema HPLC Agilen Technologies 1100, con detector de arreglo de diodos y detector de fluorescencia.

**2.1.3 Recolección y tratamiento de muestras.** Para este estudio se emplearon muestras de los 10 materiales de cacao introducidos; así como de los 11 materiales regionales más comercializados en el país (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Identificación, nombre y origen de materiales de cacao

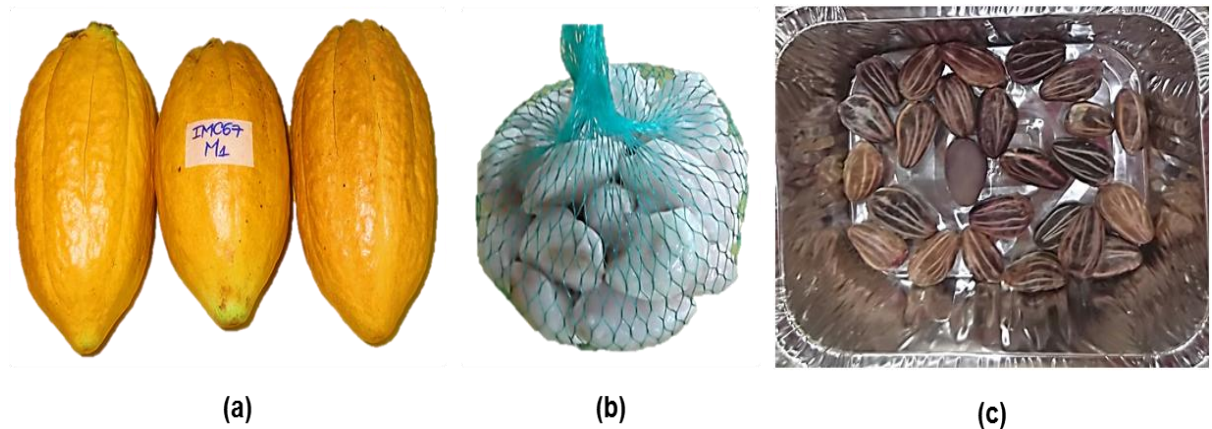
	Material	Nombre	Variedad	Origen
Regionales	CAU 39	Caucasia, Antioquia	IMC 67 * Desconocido	Colombia
	FEAR 5	Federación Arauquita	Trinitario	Colombia
	FEC 2	Federación El Carmen	Trinitario	Colombia
	FLE 2	Federación Lebrija	Trinitario	Colombia
	FLE 3	Federación Lebrija	Trinitario	Colombia
	FSA 13	Federación San Vicente - Arauca	Trinitario	Colombia
	FSV 155	Federación San Vicente	Trinitario	Colombia
	FSV 25	Federación San Vicente	Criollo	Colombia
	FSV 41	Federación San Vicente	Trinitario	Colombia
	FTA 2	Federación Tame Arauca	Trinitario	Colombia
	SCC 61	Selección Colombia Corpoica	Trinitario	Colombia
Introducidos	CCN 51	Colección Castro Naranjal	ICS 95 * IMC 67	Ecuador
	EET 8	Estación Experimental Tropical	Trinitario	Ecuador
	EET 96	Estación Experimental Tropical	Nacional*Desconocido	Ecuador
	ICS 1	Imperial CollegeSelection	Trinitario	Trinidad
	ICS 39	Imperial CollegeSelection	Trinitario	Trinidad
	ICS 6	Imperial CollegeSelection	Trinitario	Trinidad
	ICS 60	Imperial CollegeSelection	Trinitario	Trinidad
	ICS 95	Imperial CollegeSelection	Trinitario	Trinidad
	IMC 67	Iquitos Marañón Collection	Trinitario	Perú
	TSH 565	Selección Trinitario Híbrida	ICS 1 * SCA 6	Trinidad

La recolección de las muestras de cacao se llevó a cabo en la granja Villa Mónica de propiedad de la Federación Nacional de Cacaoteros ubicada en la localidad de San Vicente de Chucurí, Santander.

En la granja cada material está organizado en filas de 10 árboles. Con el fin de tomar una muestra representativa, se colectaron por cada material 6 mazorcas maduras y sanas provenientes de 6 árboles diferentes.

Los frutos recién cortados fueron procesados inmediatamente con el propósito de evitar la fermentación interna y la oxidación de las semillas. El procedimiento consistió en abrir los frutos, pesar 100 g de cada mazorca y calentar a 95°C durante 10 minutos. Una vez finalizado el escaldado, la muestra se dejó enfriar, se retiró el mucilago y se secó en la estufa a 50°C durante 24 horas (**Figura 7**). Por

último las muestras obtenidas se almacenaron al vacío, a una temperatura de 5°C durante el periodo previo a la realización de ensayos.



**Figura 7.** Obtención de frutos sanos y frescos (a), formación de grupos de 100 g (b) y secado de las semillas a 50 °C durante 24 h (c).

## 2.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA POLIFENOL OXIDASA

El ensayo de inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa en los granos de cacao frescos, se desarrolló tomando como base el modelo propuesto por Tomás – Barberán *et al.*, (2007). Con el propósito de seleccionar el tiempo óptimo de escaldado de las muestras, se realizó un experimento previo con cuatro mazorcas de ICS 60. El ensayo consistió en preparar cuatro grupos homogéneos de 100 g cada uno, los cuales se clasificaron según el tiempo de calentamiento a 95°C. Los tiempos de escaldado evaluados fueron:  $T_0 = 0$  minutos,  $T_1 = 5$  minutos,  $T_2 = 10$  minutos y  $T_3 = 15$  minutos. De cada muestra se seleccionaron algunos granos para medir de forma cualitativa el grado de oxidación de la PPO.

La prueba cualitativa de oxidación consistió en aplicar 3 gotas de solución de Catecol 1:10 v/v a cada grano y dejar reaccionar durante 10 minutos. Después de este tiempo se observó el grado pardeamiento de los granos, que se relaciona de forma directa con la actividad de la polifenol oxidasa. Para encontrar el tiempo óptimo de escaldado, se seleccionó la muestra con el menor grado de pardeamiento.

Para determinar de forma cuantitativa el efecto del tratamiento de inhibición de PPO se empleó el método de Folin-Coicalteu.

## **2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

**2.3.1 Determinación del contenido de humedad.** Para determinar la humedad se siguió el método estandarizado por la norma internacional A.O.A.C 7.003/84 y 930.15/90. Lo anterior se realizó con el propósito de calcular el peso en base seca de las muestras analizadas.

**2.3.2 Obtención de extractos.** La extracción de los compuestos fenólicos, metilxantinas y flavonoides se realizó a partir de la metodología propuesta por Perea *et al.*, (2009). Se pesaron  $1\pm 0,5$ g de muestra previamente molida, a los cuales se les retiró el material lipídico mediante tres extracciones sucesivas con hexano (10 mL), empleando un baño ultrasónico, durante 15 minutos. Una vez desengrasada la muestra se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar el hexano remanente y se procedió a realizar tres extracciones sucesivas con 20mL de etanol/agua 80:20 v/v a una temperatura de 60 °C durante 15 minutos. Finalmente el sobrenadante obtenido se concentró por rota-evaporación y se llevó a un volumen de 25mL en solución etanol/agua 50:50. Los extractos obtenidos fueron almacenados en frascos ámbar a 5°C por un tiempo no superior a 5 días.

**2.3.3 Análisis de polifenoles totales: Ensayo de Folin-Ciocalteu.** El ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu para la determinación de polifenoles totales se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Perea *et al.*, (2009). Como reactivo se utilizó una mezcla amarilla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico, que en medio básico se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ).

Inicialmente se tomaron 50 $\mu$ L de extracto y 1,5 mL de reactivo de Folin diluido diez veces, se mezclaron en un tubo de ensayo y pasados 5 minutos se adicionaron 1,5mL de carbonato de sodio 7,5% p/v. La mezcla resultante se guardó en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente y finalmente se leyó la absorbancia de las muestras por duplicado a 765nm en el espectrofotómetro, usando como blanco una mezcla del reactivo y agua destilada. La sustancia patrón fue el ácido gálico y la curva de calibración contiene diluciones entre 0,2 y 1,8mg/mL (**ANEXO A**). Los resultados reportados se expresaron como equivalentes de ácido gálico sobre gramos de muestra en base seca. (mgÁG/g<sub>ms</sub>).

**2.3.4 Análisis de la actividad antioxidante: Ensayo de la capacidad de absorción de oxígeno radical ORAC.** La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las muestras se determinó siguiendo la metodología propuesta por Huang, *et al.*, (2002), en donde se midió la inhibición de la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína, empleada como indicador molecular, por ser centro de ataque de los radicales peroxilo generados por el AAPH. La protección antioxidante se calculó a partir de la diferencia entre el área de la fluorescencia bajo la curva AUC de cada muestra y el blanco. El procedimiento consistió en adicionar en un pozo de una microplaca 150 $\mu$ L de fluoresceína  $8,16 \times 10^{-5}$ mM y 25 $\mu$ L de muestra. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 minutos con agitación. Posteriormente se añadieron al pozo 25 $\mu$ L de

AAPH 153mM y se midió la fluorescencia en el espectrofluorímetro cada minuto durante 1 hora a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Como blanco se usó una mezcla de fluoresceína, buffer fosfato 75 mM, pH 7,4 y AAPH. La sustancia patrón fue el Trolox. La curva de calibración contiene diluciones entre 3,125 y 50µM (**ANEXO B**). Los resultados reportados se expresaron como µmoles de Trolox sobre miligramo de muestra seca. (µmolT/mg<sub>ms</sub>).

**2.3.5 Identificación y cuantificación de metilxantinas y flavonoides por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia/eficacia HPLC.** El análisis cromatográfico de los extractos fenólicos se realizó en un cromatógrafo *Agilent Technologies 1100*, (Palo Alto, CA, EE.UU.) controlado por el software *ChemStation*, equipado con una columna en fase reversa (Zorbax Eclipse XDB de medidas 150 mm x 2.1 mm) con tamaño de partícula de 5 µm, a una temperatura de 35°C.

La determinación simultánea de flavonoides y metilxantinas se llevó a cabo según la metodología validada por el CICTA, la cual se desarrolló tomando como referencia los procedimientos descritos por Schinella *et al.* (2010), Cienfuegos-Jovellanos *et al* (2009) y Tomas-Barberan *et al.* (2007).

La identificación de los metabolitos presentes en los extractos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención con los de sustancias de referencia certificadas. La cuantificación se realizó por el método de estándar externo usando curvas de calibración de las sustancias patrón: teobromina, cafeína, (-) epicatequina, (+) catequina, con concentraciones entre 0,5 ppm y 250 ppm (**ANEXO C**). La cuantificación de teobromina y cafeína se efectuó a 275 nm con un detector UV-DAD, mientras que la epicatequina se cuantificó a 280 nm. Para la detección de la catequina se empleó un detector de fluorescencia con una longitud de onda de 278 nm para excitación y 315 nm para la emisión.

El procedimiento consistió en tomar el extracto y realizar una dilución 1:4 en agua tipo 1, después la dilución se pasó a través de un filtro de PTFE de 0,45µm antes de ser inyectada. Las condiciones de trabajo fueron:

Flujo de 0,6mL/min.

Solvente A: Agua/acido fórmico 955 v/v.

Solvente B: Acetonitrilo.

Gradiente: 0-20 min, 6-10% B; 20-25 min, 10-13% B; 25-30 min, 13-15% B; 30-40 min, 15-10%B; 40-45 min, 10-6% B.

Temperatura: 35°C.

Re-equilibración: 10 min.

Finalmente los resultados se expresaron como mg del respectivo patrón sobre gramo de muestra seca.

**2.3.6 Obtención de extractos liofilizados.** La extracción de los compuestos fenólicos, metilxantinas y flavonoides se realizó en base a la metodología descrita en la **Sección 2.3.2**. Los extractos obtenidos de ICS 39 y té verde se concentraron por rota-evaporación hasta un volumen de 2 mL, después se almacenaron durante 24 h a una temperatura de -80°C. Finalmente los extractos se liofilizaron durante 24 h hasta obtener un polvo fino y seco.

**2.3.7 Análisis de la actividad antioxidante (ORAC), de extractos liofilizados de ICS 39, té verde y patrones comerciales.** La capacidad antioxidante de las muestras se determinó a partir de la metodología descrita en la **Sección 2.3.4**. De

cada muestra se realizó una curva que contiene diluciones entre 700 y 12500 $\mu$ g/L. Los resultados reportados se expresaron como área neta experimental (**AUC**).

**2.3.8 Análisis estadístico.** Todas las mediciones se realizan por duplicado y para cada material se analizaron en total 6 muestras ( $n = 6$ ). Todos los resultados obtenidos por cada variable evaluada se sometieron inicialmente a un estudio exploratorio, que permitió describir las características de los distintos materiales mediante métodos estadísticos descriptivos como: la media, error típico de la media, la desviación estándar (DE), el rango de variación y el coeficiente de variación. Por otra parte, la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, permitió determinar diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de los materiales, su clasificación y agrupación se realizó a partir de dendrogramas.

Posteriormente se efectuó un análisis de correlación lineal de Pearson entre los distintos pares de variables del estudio, con el propósito de identificar si existe una relación entre estas variables.

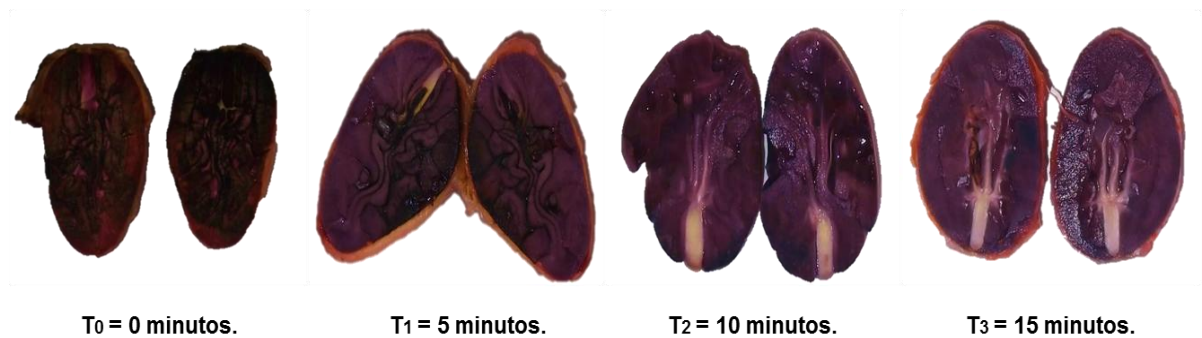
Adicionalmente se realizó un análisis de componentes principales (**ACP**), con el propósito de reducir la dimensión del conjunto de datos, los cuales se representaron a través de nuevos componentes, que de forma independiente explican el mayor porcentaje de la información. Por último se aplicó el análisis de conglomerados, para agrupar materiales o variables en grupos homogéneos, con base en las similitudes existentes.

Para el procesamiento de la información la base de datos obtenida fue registrada con el software Microsoft® Excel 2010. Los análisis fueron realizados en los software estadísticos Statgraphics® Centurion XV.I y StatisticalPackageforthe Social Sciences® (SPSS 18.0).

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA

Previo a la determinación del contenido de polifenoles totales y de la actividad antioxidante de las diferentes muestras de cacao, fue necesario optimizar el método de inhibición de la actividad enzimática de la enzima PPO. En la **Figura 8** se muestran los resultados experimentales de la inactivación de la enzima PPO, medidos como el grado de pardeamiento en cuatro grupos de granos del material ICS 60, clasificados según el tiempo de calentamiento a 95°C.



**Figura 8.** Resultados de la inactivación de la enzima polifenol oxidasa en cuatro grupos de ICS 60.

El experimento realizado en campo demostró que el tiempo necesario para inhibir la enzima PPO corresponde a 10 minutos, debido a que fue el grupo que presentó menor pardeamiento de grano. Aunque la muestra T<sub>3</sub> también presentó bajo pardeamiento, el largo tiempo de exposición de los granos al tratamiento térmico,

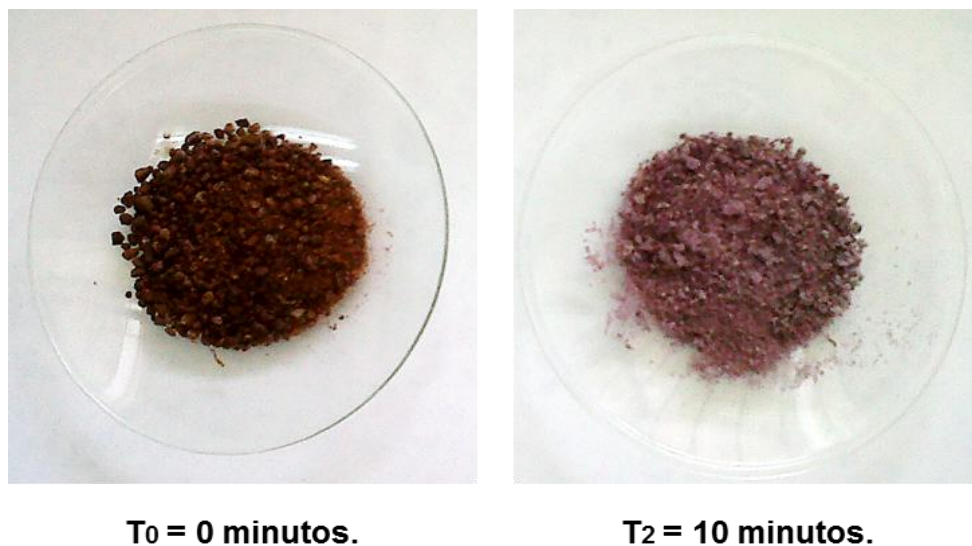
termina por producir sangrado de los granos, lo que puede representar una pérdida de polifenoles.

Una vez seleccionado de forma cualitativa el tiempo óptimo de escaldado de las muestras, se midió el efecto del pretratamiento de los granos, evaluando el contenido de polifenoles totales en las muestras escaldadas ( $T_2$ ) y sin escaldar ( $T_0$ ). Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de inhibición de la enzima polifenol oxidasa logra mantener constante el contenido de polifenoles presentes en el grano fresco (**Tabla 3**)

**Tabla 3.** Contenido de polifenoles totales de las semillas de ICS 60 tratados con calentamiento a 95°C durante los tiempos cero ( $T_0$ ) y 10 minutos ( $T_2$ ).

<b>Tiempo de calentamiento a 95°C</b>	<b>Polifenoles totales (mg EAG/g<sub>ms</sub>)</b>
0 minutos ( $T_0$ )	59,29 ± 3,66
10 minutos ( $T_2$ )	61,22 ± 4,30

Tal como se observa en la **Figura 9**, el pretratamiento seleccionado permite obtener un polvo violeta rico en polifenoles y estable a los procesos de oxidación. Lo anterior permite obtener una estimación más confiable del contenido total de polifenoles en las semillas frescas y de esta manera establecer comparaciones entre materiales. Adicionalmente, el tratamiento facilita la manipulación y almacenamiento de las muestras, disminuyendo las pérdidas de polifenoles causadas por los proceso de oxidación.



**Figura 9.**Polvo de cacao de ICS 60 sin tratamiento T<sub>0</sub> y con tratamiento T<sub>2</sub>.

### 3.2 EVALUACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Una vez seleccionadas las condiciones de tratamiento de las muestras, se procedió a extraer los compuestos fenólicos de los 21 materiales de cacao bajo estudio. El contenido de polifenoles totales, medido por el método de Folin-Ciocalteu, reveló que existen diferencias estadísticamente significativas entre materiales para esta variable, lo que favoreció su clasificación en tres grupos (**Tabla 4**): grupo **a** con alto contenido de polifenoles (69,88 – 74,47 mgEÁG/g<sub>ms</sub>), grupo **b** con un contenido intermedio (59,92 - 57,16 mgEÁG/g<sub>ms</sub>), y el grupo **c**, con el menor contenido (47,63 - 55,65 mgEÁG/g<sub>ms</sub>).

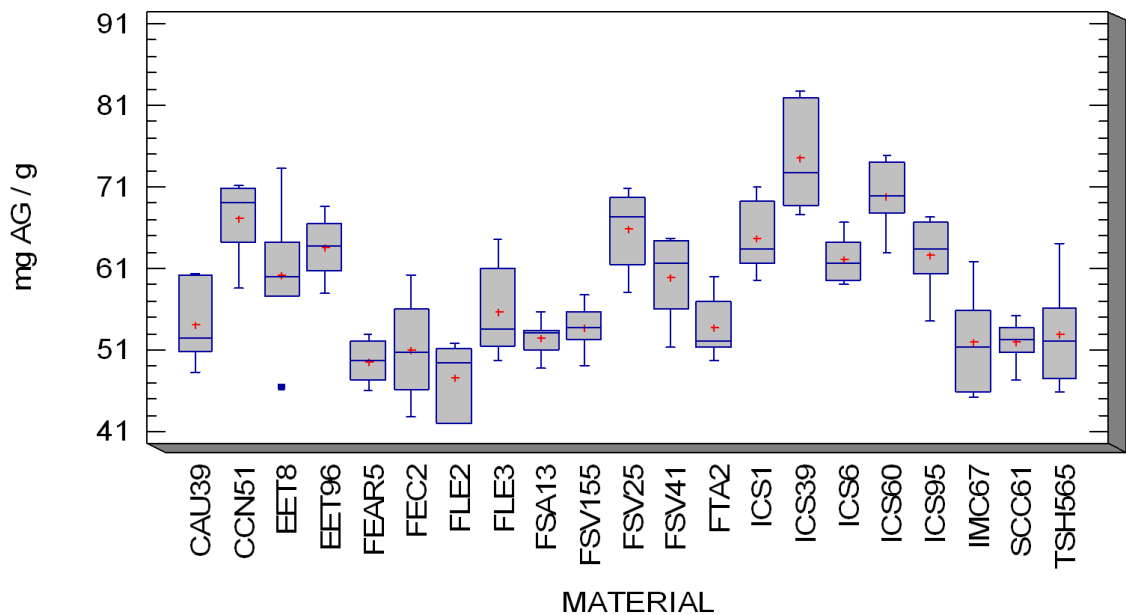
**Tabla 4.** Contenido de polifenoles totales en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

	<b>Material</b>	<b>Polifenoles totales (mg EAG/g<sub>ms</sub>)</b>
<b>Regionales</b>	CAU 39	54,10 ± 5,11 <sub>c</sub>
	FEAR 5	49,60 ± 2,69 <sub>c</sub>
	FEC 2	51,07 ± 6,46 <sub>c</sub>
	FLE 2	47,63 ± 4,48 <sub>c</sub>
	FLE 3	55,65 ± 5,90 <sub>c</sub>
	FSA 13	52,53 ± 2,33 <sub>c</sub>
	FSV 155	53,75 ± 2,94 <sub>c</sub>
	FSV 25	65,76 ± 5,07 <sub>b</sub>
	FSV 41	59,92 ± 5,48 <sub>b</sub>
	FTA 2	53,74 ± 3,97 <sub>c</sub>
SCC 61	51,92 ± 2,86 <sub>c</sub>	
<b>Introducidos</b>	CCN 51	67,16 ± 4,98 <sub>b</sub>
	EET 8	60,25 ± 8,74 <sub>b</sub>
	EET 96	63,54 ± 3,82 <sub>b</sub>
	ICS 1	64,68 ± 4,56 <sub>b</sub>
	<b>ICS 39</b>	<b>74,47 ± 6,51<sub>a</sub></b>
	ICS 6	62,12 ± 3,11 <sub>b</sub>
	<b>ICS 60</b>	<b>69,88 ± 4,39<sub>a</sub></b>
	ICS 95	62,59 ± 4,83 <sub>b</sub>
	IMC 67	51,89 ± 6,66 <sub>c</sub>
	TSH 565	52,97 ± 6,67 <sub>c</sub>

Todos los resultados se expresan como la media ± desviación estándar para n = 6. Las letras expresan diferencias significativas con nivel de confianza p ≤ 0,05.

Según la **Tabla 4**, los materiales regionales pertenecen principalmente al grupo **c**, a excepción del FSV 41 y FSV 25 que hacen parte del grupo **b**. Por otra parte los materiales introducidos se distribuyen a lo largo de los tres grupos, donde se resalta el ICS 39 e ICS 60 por su elevado contenido de polifenoles totales.

Adicionalmente a través de los diagramas de cajas para la variable polifenoles totales (**Figura 10**), se consigue visualizar la dispersión, simetría y asimetría de los datos.



**Figura 10.** Diagrama de cajas para la variable polifenoles totales de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

El diagrama de la **Figura 10**, señala que las medidas de los polifenoles totales oscilaron entre 47,63 y 74,47 mgEÁG/g<sub>ms</sub>, estos valores corresponden a la media aritmética de los clones FLE 2 e ICS 39, los cuales están representados a través de una cruz roja dentro de su propia caja.

Respecto a la simetría de la población encontramos que los materiales EET 96, FEAR 5, FSV 155 y ICS 60 son simétricos porque la media aritmética coincide con la mediana, lo cual sugiere que los datos obtenidos para cada material (n = 6) son homogéneos y presentan poca variabilidad.

Los materiales CAU 39, FEC 2, FLE 3, FTA 2, ICS 1, ICS 39, ICS 6, IMC 67 y TSH 565 presentan una asimetría positiva, y encontramos que la media aritmética es mayor que la mediana. Por el contrario los materiales CCN 51, FLE 2, FSA 13, FSV 25, FSV 41, ICS 95 y SCC 61 son asimétricos negativamente, en donde la media aritmética suele ser menor que la mediana.

La asimetría en algunos materiales se manifiesta debido a la alta probabilidad de encontrar diferencias genóticas en las semillas provenientes de la misma mazorca, por ejemplo en la **Figura 11** aparecen las semillas sin fermentar del FSV 155 simétrico y FSV 41 asimétrico, donde se observa que las semillas de una misma mazorca de FSV 41 son muy heterogéneos en sus características físicas como color y forma, mientras que los granos de FSV 155 son más homogéneos.



**Figura 11.** Características morfológicas de tamaño y color para materiales tipo criollo, como FSV 41 y FSV 155.

En la **Tabla 5** se encuentran los resultados del contenido de polifenoles totales reportados por diversos autores en semillas de cacao sin procesar y en semillas con inhibición enzimática.

**Tabla 5.** Polifenoles totales en muestras de semillas de cacao de diferentes orígenes.

Tipo de muestra	Polifenoles totales	Fuente
Semillas sin procesar	35mg EAG/g <sub>ms</sub>	Ramírez <i>et al.</i> , 2010
Semillas sin procesar	70 – 80mg EAG/g <sub>ms</sub>	Jonfia-Essienet <i>et al.</i> , 2008
Semillas sin procesar	71,42 – 82,68mg EAG/g <sub>ms</sub>	Hiet <i>et al.</i> , 2009
Semillas (inactivación PPO)	40,0-84,14mg EAG/g <sub>ms</sub>	Tomás-Barberán <i>et al.</i> , 2007
Semillas (inactivación PPO)	44,94 y 70,00mg EAG/g <sub>p.s.l.g</sub>	Carrillo <i>et al.</i> , 2013
Semillas (inactivación PPO)	52,13 - 62,83mg EAG/g <sub>p.s.l.g</sub>	Philips <i>et al.</i> , 2012
Semillas (inactivación PPO)	67 – 149 mg(-)-EC/g <sub>ms</sub>	Niemenak <i>et al.</i> , 2006

Los resultados obtenidos para polifenoles totales en el presente trabajo(47,63 - 74,47 mgEAG/gms) fueron superiores a los reportados por Ramírez *et al.*, (2010), similares a los encontrados por: Tomás-Barberán*et al.*, (2007) y Jonfia-Essien*et al.*, (2008) los cuales estudiaron cacao de tipo criollo y trinitario; pero inferiores a los reportados por: Hii*et al.*, (2009), quien estudio materiales provenientes de Malasia.

Por otra parte los resultados obtenidos por Carrillo *et al.*, (2013) y Philips *et al.*, (2012), para materiales de Colombia y Costa Rica, fueron expresados como muestra seca libre de grasa (**p.s.l.g**), lo que permite considerar un contenido de polifenoles totales inferior al encontrado en este estudio.

Finalmente Niemenak*et al.*, (2006) indico valores entre 67 - 149 mg/g, expresados como equivalentes de (-)-Epicatequina (mg/g).

### **3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

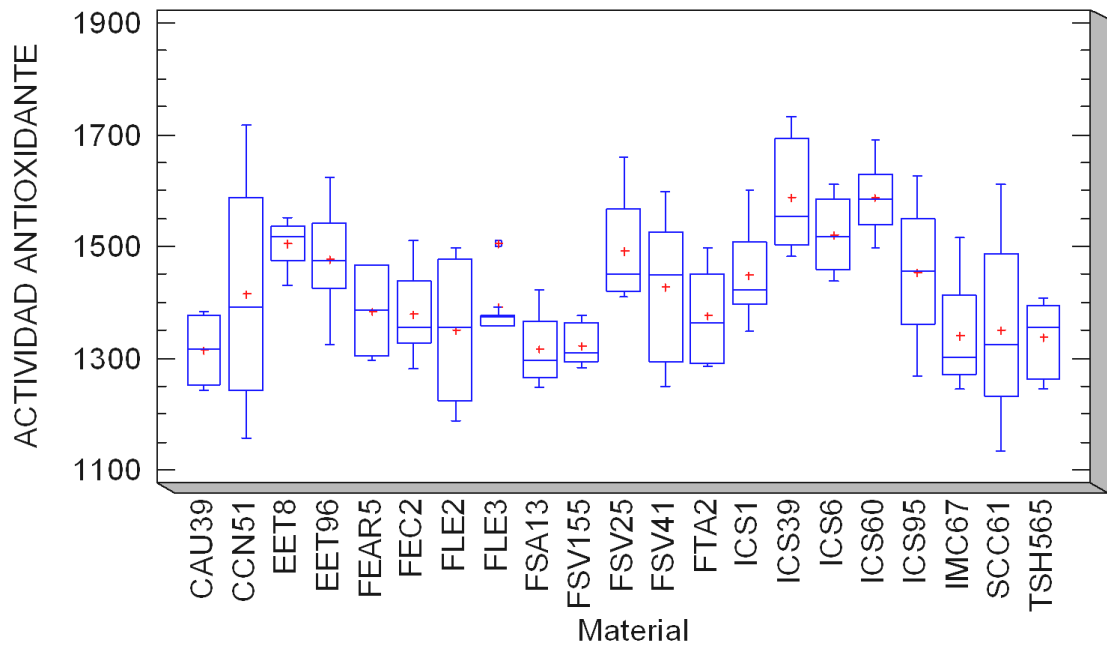
La actividad antioxidante de los materiales estudiados, mostró que existen diferencias significativas entre los clones para esta variable, lo que permitió clasificarlos en grupos homogéneos con contenidos altos **a** (1477,91 – 1587,53  $\mu\text{M}$  Trolox/g<sub>ms</sub>), intermedios **b** (1376,06 – 1452,65  $\mu\text{M}$  Trolox/g<sub>ms</sub>), y bajos **c** (1314,38 – 1351,43  $\mu\text{M}$  Trolox/g<sub>ms</sub>), como lo muestra la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Actividad antioxidante en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

	<b>Material</b>	<b>Actividad antioxidante (<math>\mu\text{M Trolox/g}_{\text{ms}}</math>)</b>
<b>Regionales</b>	CAU 39	1314,38 $\pm$ 72,74 <sub>c</sub>
	FEAR 5	1384,32 $\pm$ 93,93 <sub>b</sub>
	FEC 2	1377,91 $\pm$ 83,76 <sub>b</sub>
	FLE 2	1349,94 $\pm$ 150,52 <sub>c</sub>
	FLE 3	1390,42 $\pm$ 56,53 <sub>b</sub>
	FSA 13	1316,03 $\pm$ 75,13 <sub>c</sub>
	FSV 155	1322,51 $\pm$ 38,81 <sub>c</sub>
	FSV 25	1492,64 $\pm$ 114,3 <sub>a</sub>
	FSV 41	1428,13 $\pm$ 135,17 <sub>b</sub>
	FTA 2	1376,06 $\pm$ 84,41 <sub>b</sub>
SCC 61	1351,43 $\pm$ 173,03 <sub>c</sub>	
<b>Introducidos</b>	CCN 51	1414,23 $\pm$ 236,15 <sub>b</sub>
	EET 8	1505,17 $\pm$ 52,09 <sub>a</sub>
	EET 96	1477,91 $\pm$ 112,88 <sub>a</sub>
	ICS 1	1449,62 $\pm$ 90,45 <sub>b</sub>
	<b>ICS 39</b>	<b>1586,71 <math>\pm</math> 102,55<sub>a</sub></b>
	ICS 6	1521,17 $\pm$ 77,54 <sub>a</sub>
	<b>ICS 60</b>	<b>1587,53 <math>\pm</math> 71,47<sub>a</sub></b>
	ICS 95	1452,65 $\pm$ 130,79 <sub>b</sub>
	IMC 67	1340,92 $\pm$ 119,66 <sub>c</sub>
	TSH 565	1336,62 $\pm$ 69,83 <sub>c</sub>

Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para n = 6. Las letras expresan diferencias significativas con nivel de confianza  $p \leq 0,05$ .

A continuación los diagramas de cajas para la actividad antioxidante que presenta la **Figura 12**, revelan que la media aritmética de los materiales oscila entre 1314,38 (CAU 39) y 1587,53 $\mu\text{M Trolox/g}_{\text{ms}}$  (ICS 60). Además señalan que los materiales simétricos para esta variable son: ICS 6, ICS 95, FEAR 5, ICS 60 y EET 96, así mismo los materiales con asimetría positiva son: CCN 51, FSA 13, FSV 155, FSV 25, SCC61, FEC 2, FTA 2, ICS 1, ICS 39 y IMC 67. Por último los asimétricos negativamente son: CAU 39, EET 8, TSH 565, FLE 2 y FSV 41.



**Figura 12.** Diagrama de cajas para la actividad antioxidante de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

Los resultados obtenidos para la actividad antioxidante medidos por el método ORAC (1.314,38 - 1.587,53  $\mu\text{M}$  Trolox/ $\text{g}_{\text{ms}}$ ), fueron superiores a los reportados por: Adamson *et al.*, (1999) (434  $\mu\text{M}$  Trolox/ $\text{g}_{\text{ms}}$ ), Guet *et al.*, (2006) (820  $\mu\text{M}$  Trolox/ $\text{g}_{\text{ms}}$ ) y Carrillo *et al.*, (2013) (391,3 - 639,51  $\mu\text{M}$  trolox/ $\text{g}_{\text{mslg}}$ ). Este último autor evaluó semillas de cacao Colombiano.

Finalmente los resultados de esta investigación revelan, que los materiales estudiados tienen la capacidad de absorber oxígeno radical, lo que confirma sus efectos benéficos en la salud.

### 3.4 EVALUACIÓN DE (-) EPICATEQUINA Y (±) CATEQUINA

En esta sección se presentan los resultados de la cuantificación del contenido de los flavonoides (-)-epicatequina y (±)-catequina, en las semillas sin fermentar de los 21 materiales evaluados. Los resultados encontrados para estas variables permitieron la clasificación de los materiales en tres grupos con diferencias estadísticas (**Tabla 7**).

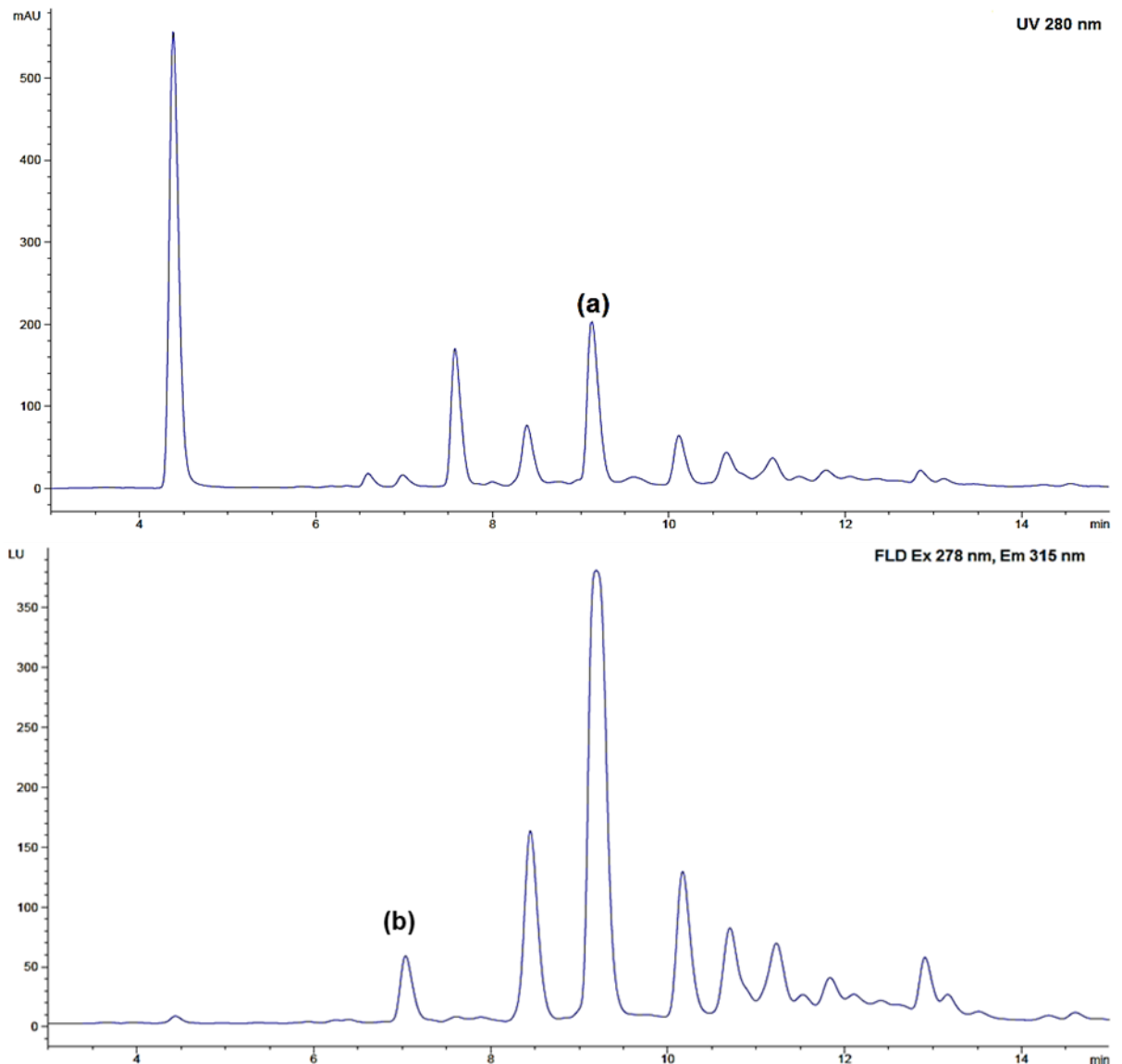
**Tabla 7.** Contenido de flavonoides en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

		Flavonoides (mg/g <sub>ms</sub> )			
		Material	Catequina	Epicatequina	CT
Regionales	CAU 39	1,05 ± 0,17 <sub>b</sub>	1,57 ± 0,24 <sub>b</sub>	2,63 ± 0,37 <sub>b</sub>	
	FEAR 5	0,96 ± 0,14 <sub>c</sub>	1,64 ± 0,15 <sub>b</sub>	2,60 ± 0,25 <sub>b</sub>	
	FEC 2	1,01 ± 0,20 <sub>b</sub>	1,57 ± 0,16 <sub>b</sub>	2,59 ± 0,33 <sub>b</sub>	
	FLE 2	0,74 ± 0,12 <sub>c</sub>	1,46 ± 0,17 <sub>c</sub>	2,20 ± 0,28 <sub>c</sub>	
	FLE 3	1,43 ± 0,11 <sub>a</sub>	1,70 ± 0,14 <sub>b</sub>	3,13 ± 0,22 <sub>b</sub>	
	FSA 13	1,30 ± 0,09 <sub>b</sub>	1,62 ± 0,09 <sub>b</sub>	2,92 ± 0,12 <sub>b</sub>	
	FSV 155	1,49 ± 0,13 <sub>a</sub>	1,69 ± 0,10 <sub>b</sub>	3,18 ± 0,22 <sub>b</sub>	
	FSV 25	1,01 ± 0,09 <sub>b</sub>	1,88 ± 0,09 <sub>a</sub>	2,90 ± 0,15 <sub>a</sub>	
	FSV 41	1,58 ± 0,23 <sub>a</sub>	1,67 ± 0,20 <sub>b</sub>	3,25 ± 0,41 <sub>a</sub>	
	FTA 2	1,01 ± 0,13 <sub>b</sub>	1,45 ± 0,09 <sub>c</sub>	2,46 ± 0,15 <sub>c</sub>	
	SCC 61	0,86 ± 0,07 <sub>c</sub>	1,57 ± 0,11 <sub>b</sub>	2,42 ± 0,12 <sub>c</sub>	
Introducidos	CCN 51	1,86 ± 0,17 <sub>b</sub>	1,09 ± 0,10 <sub>a</sub>	2,95 ± 0,26 <sub>b</sub>	
	EET 8	1,88 ± 0,27 <sub>c</sub>	0,87 ± 0,22 <sub>a</sub>	2,75 ± 0,23 <sub>a</sub>	
	EET 96	2,01 ± 0,13 <sub>b</sub>	1,30 ± 0,10 <sub>a</sub>	3,31 ± 0,22 <sub>b</sub>	
	ICS 1	1,68 ± 0,13 <sub>b</sub>	1,04 ± 0,13 <sub>b</sub>	2,73 ± 0,14 <sub>b</sub>	
	<b>ICS 39</b>	2,02 ± 0,20 <sub>b</sub>	1,14 ± 0,11 <sub>a</sub>	3,16 ± 0,26 <sub>a</sub>	
	ICS 6	2,14 ± 0,22 <sub>b</sub>	1,17 ± 0,23 <sub>a</sub>	3,31 ± 0,43 <sub>a</sub>	
	<b>ICS 60</b>	1,99 ± 0,13 <sub>b</sub>	1,15 ± 0,17 <sub>a</sub>	3,14 ± 0,22 <sub>a</sub>	
	ICS 95	1,81 ± 0,17 <sub>b</sub>	1,06 ± 0,14 <sub>a</sub>	2,86 ± 0,29 <sub>b</sub>	
	IMC 67	1,40 ± 0,16 <sub>c</sub>	0,92 ± 0,13 <sub>c</sub>	2,32 ± 0,29 <sub>c</sub>	
	TSH 565	1,49 ± 0,18 <sub>c</sub>	0,71 ± 0,15 <sub>c</sub>	2,20 ± 0,33 <sub>c</sub>	

Todos los resultados se expresan como la media ± desviación estándar para n = 6.

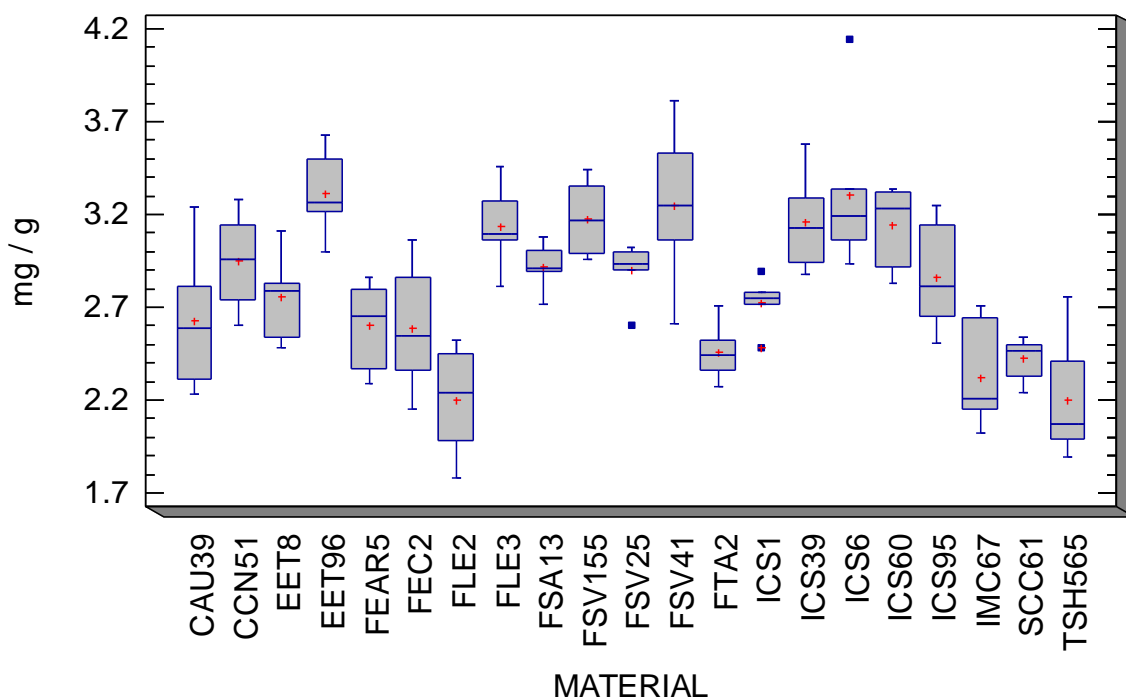
Las letras expresan diferencias significativas con nivel de confianza p ≤ 0,05.

En la **Figura 13** se presenta el perfil cromatográfico típico de los extractos de las semillas sin fermentar de cacao, donde se indican las señales correspondientes a los flavonoides (-)-epicatequina (**a**) y (±)-catequina (**b**). Los cromatogramas obtenidos para cada material evaluado se encuentran en el **ANEXO D**.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico de (-)-epicatequina (**a**) y (±)-catequina (**b**) de un extracto de semilla seca sin fermentar de ICS 39.

La **Figura 14** presenta los diagramas de cajas para catequinas totales (**CT**), donde la media aritmética oscila entre 2,2 y 3,31 mg/g<sub>ms</sub>. Los materiales que hacen parte del límite inferior son ICS 6 y EET 96. Por el contrario el FLE 2 y TSH 565 se destacan por establecer el límite superior.



**Figura 14.** Diagrama de cajas para catequinas totales de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

**Tabla 8.** Resultados del contenido de (-)-epicatequina y (±)-catequina en semillas de cacao de diferentes estudios.

Fuente	(-)-Epicatequina	(±)-Catequina	Cuantificación (Extracción)
Resultados del estudio., 2013	0,71 – 1,88 mg/g <sub>ms</sub>	0,74 – 2,14 mg/g <sub>ms</sub>	RP-HPLC (Simultanea)
Carrillo <i>et al.</i> , 2013	1,4-3,5 mg/g <sub>p.s.l.g</sub>	0,2-1,3 mg/g <sub>p.s.l.g</sub>	RP-HPLC (Simultanea)
Philips <i>et al.</i> , 2012	2,22 – 4,63 mg/g <sub>p.s.l.g</sub>	0,16-0,32 mg/g <sub>p.s.l.g</sub>	No hay descripción
Niemenaket <i>al.</i> , 2006	14,43 mg/g	1,25g/mg	RP-HPLC (específica)
Gottiet <i>al.</i> , 2006	4,10 mg/g	0,06 mg/g	CD-MEKC (Especifica)

Los resultados expresados en la tabla corresponden a semillas sin fermentar

Los resultados obtenidos en el presente estudio para (-)-epicatequina (0,71 – 1,88 mg/g<sub>ms</sub>) fueron en promedio inferiores a los reportados por los autores mencionados en la **Tabla 8**. Sin embargo el 48% de los materiales evaluados presentan valores promedio de (-)-epicatequina similares a los reportados por Carillo *et al.*,(2013).

El contenido de (-)-epicatequina es menor debido a los diferentes métodos de extracción empleados y al tipo de cuantificación utilizada, por tanto los resultados obtenidos en el presente estudio no son comparables con los autores de la **Tabla 8**. En la presente investigación se realizó una extracción simultanea de metilxantinas y flavonoides, además su cuantificación se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia/eficacia en fase reversa (**RP-HPLC**).

Por otra parte los resultados para (±)-catequina (0,74 – 2,14 mg/g<sub>ms</sub>) fueron superiores a los obtenidos por los autores señalados en la **Tabla 8**. Los valores encontrados por Niemenak *et al.*, (2006) y Carrillo *et al* (2013) son similares a los encontrados en el presente trabajo.

### 3.5 EVALUACIÓN DE CAFEÍNA Y TEOBROMINA

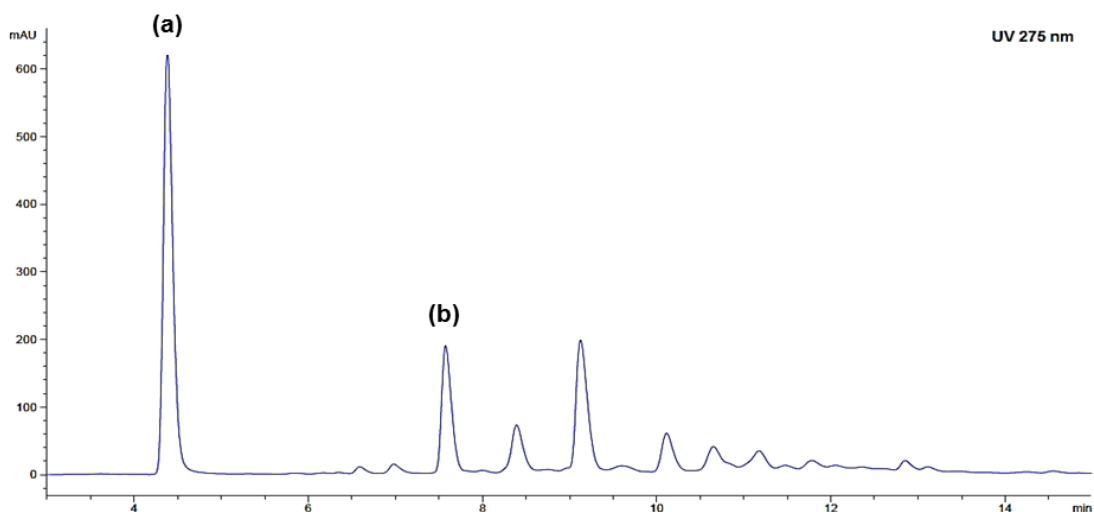
En esta sección se presentan los resultados de la cuantificación de teobromina y cafeína en las semillas sin fermentar de los materiales estudiados. Los resultados encontrados para estas variables fueron clasificados a través de la prueba de Kruskal Wallis en tres grupos homogéneos con diferencias estadísticas (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Contenido de metilxantinas en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

	<b>Metilxantinas (mg/g<sub>ms</sub>)</b>		
	<b>Material</b>	<b>Teobromina</b>	<b>Cafeína</b>
<b>Regionales</b>	CAU 39	11,54 ± 1,26 <sub>b</sub>	1,88 ± 0,32 <sub>c</sub>
	FEAR 5	8,93 ± 1,06 <sub>c</sub>	2,15 ± 0,51 <sub>b</sub>
	FEC 2	9,55 ± 0,82 <sub>c</sub>	1,61 ± 0,27 <sub>c</sub>
	FLE 2	8,34 ± 0,79 <sub>c</sub>	4,14 ± 0,26 <sub>a</sub>
	FLE 3	9,76 ± 0,88 <sub>c</sub>	2,41 ± 0,49 <sub>b</sub>
	FSA 13	10,03 ± 0,56 <sub>c</sub>	1,38 ± 0,24 <sub>c</sub>
	FSV 155	9,05 ± 0,70 <sub>c</sub>	3,26 ± 0,63 <sub>b</sub>
	FSV 25	9,85 ± 1,04 <sub>c</sub>	2,40 ± 0,42 <sub>b</sub>
	FSV 41	8,06 ± 1,01 <sub>c</sub>	2,96 ± 0,38 <sub>b</sub>
	FTA 2	8,31 ± 0,22 <sub>c</sub>	1,20 ± 0,40 <sub>c</sub>
	SCC 61	10,57 ± 0,76 <sub>b</sub>	1,75 ± 0,62 <sub>c</sub>
<b>Introducidos</b>	CCN 51	10,89 ± 0,43 <sub>b</sub>	2,47 ± 0,43 <sub>b</sub>
	EET 8	10,62 ± 1,35 <sub>b</sub>	4,00 ± 0,81 <sub>a</sub>
	EET 96	10,98 ± 1,17 <sub>b</sub>	2,56 ± 0,27 <sub>b</sub>
	ICS 1	8,71 ± 0,53 <sub>c</sub>	2,91 ± 0,58 <sub>b</sub>
	<b>ICS 39</b>	11,77 ± 2,16 <sub>b</sub>	4,22 ± 1,08 <sub>a</sub>
	ICS 6	13,34 ± 1,06 <sub>a</sub>	3,09 ± 0,41 <sub>b</sub>
	<b>ICS 60</b>	11,10 ± 1,07 <sub>b</sub>	3,87 ± 0,88 <sub>a</sub>
	ICS 95	10,87 ± 0,73 <sub>b</sub>	2,86 ± 0,48 <sub>b</sub>
	IMC 67	10,58 ± 1,20 <sub>b</sub>	1,87 ± 0,56 <sub>c</sub>
	TSH 565	9,11 ± 0,94 <sub>c</sub>	2,09 ± 0,44 <sub>b</sub>

Todos los resultados se expresan como la media ± desviación estándar para n = 6. Las letras expresan diferencias significativas con nivel de confianza p ≤ 0,05.

En la **Figura 15** se presenta el perfil cromatográfico típico de los extractos de las semillas sin fermentar de cacao, donde se indican las señales correspondientes a las metilxantinas teobromina y cafeína. Los cromatogramas obtenidos para cada material evaluado se encuentran en el **ANEXO D**.



**Figura 15.** Perfil cromatográfico de teobromina (a) y cafeína (b) de un extracto de semilla seca sin fermentar de ICS 39.

Los resultados obtenidos para teobromina (8,06 – 13,34 mg/g<sub>ms</sub>) fueron superiores a los reportados por Carrillo *et al.*, (2013) (7,01-9,69 mg/g<sub>p.s.l.g</sub>), pero inferiores a los reportados por Belscaket *et al.*, (2009) (15,50 mg/g<sub>ms</sub>) y Philips *et al.*, (2012) (18,9-30,6 mg/g<sub>p.s.l.g</sub>), quien estudió semillas de cacao provenientes de Costa Rica. Los resultados encontrados para cafeína (1,2 y 4,22 mg/g<sub>ms</sub>) fueron superiores a los reportados por Carrillo *et al.*, (2013) (0,72-1,88 mg/g<sub>p.s.l.g</sub>) y Belscaket *et al.*, (2009) (1,8 mg/g<sub>ms</sub>).

**3.5.1 Relación teobromina/cafeína en semillas secas sin fermentar.** Estudios preliminares han demostrado que existe una relación importante entre el material genético y el contenido de metilxantinas (Davrieux *et al.*, 2004; Brunetto *et al.*, 2007). Según Amores *et al.*, (2009) la relación teobromina/cafeína permite clasificar los materiales como Criollos, Trinitarios y Forasteros. En la **Tabla 10** se

presenta la relación teobromina/tafeína para los diferentes grupos genéticos de cacao.

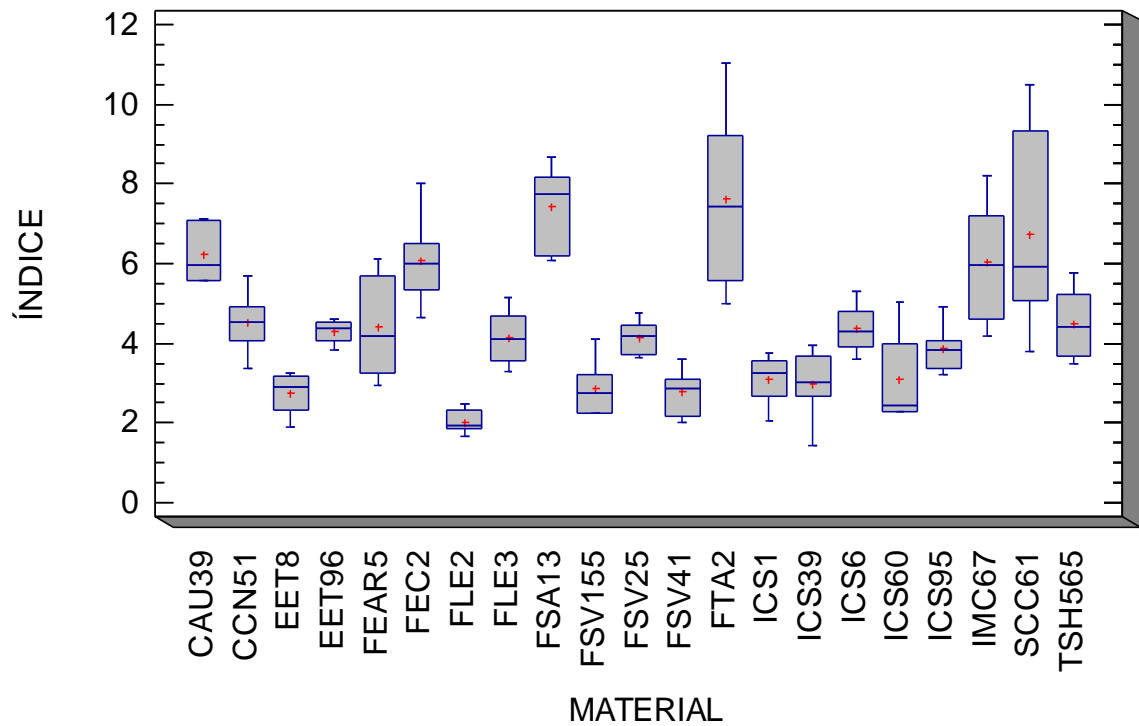
**Tabla 10.** Relación teobromina/cafeína para diferentes grupos genéticos de cacao.

<b>Grupo genético</b>	<b>Relación teobromina/cafeína</b>
Cacao Forastero	10 – 15
Cacao Trinitario	5 – 10
Cacao Criollo	1 – 2

**Fuente.**Amores *et al.*, 2009.

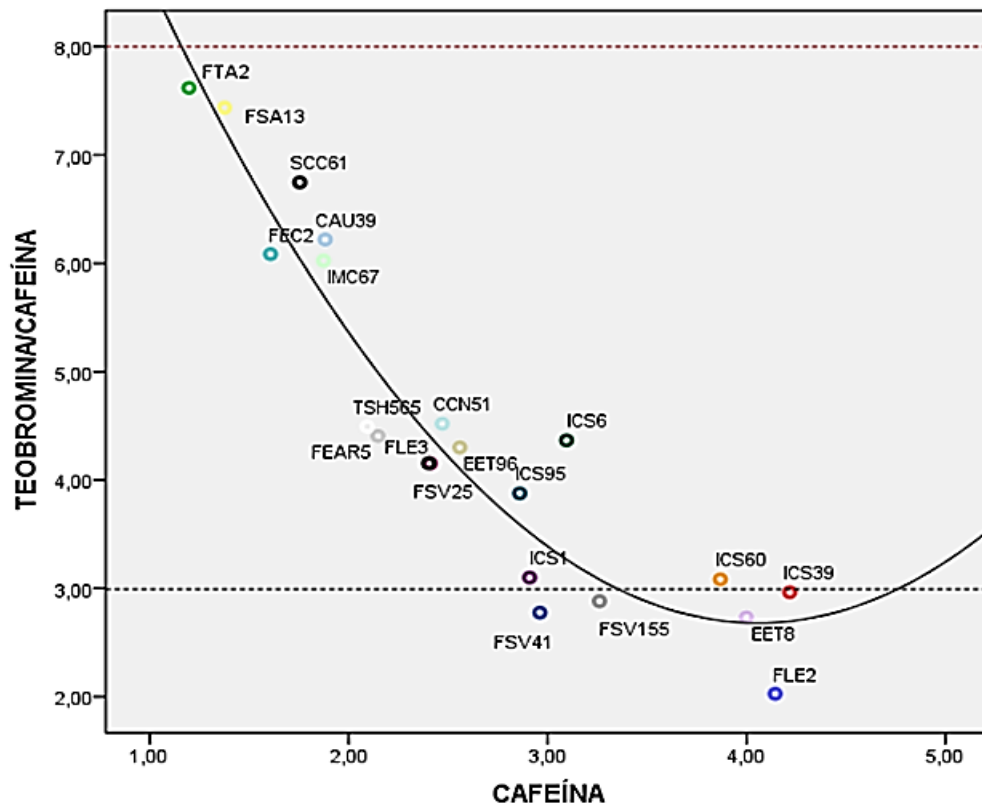
Según lo anterior, se calculó la relación teobromina/cafeína en los 21 materiales evaluados. Los resultados se ilustran en el diagrama de la **Figura 16**, el cual señala que la proporción de teobromina/cafeína fluctúa entre 2,03 y 7,62.

Los materiales con alto índice entre las variables son: FTA 2 (7,62), FSA-13 (7,44), SCC 61 (6,75), CAU 39 (6,22), FEC 2 (6,09) e IMC 67 (6,03). En cambio el FLE 2 (2,03), EET 8 (2,73), FSV 41 (2,78), FSV 155 (2,88), ICS 39 (2,96), ICS 60 (3,08) e ICS 1 (3,10) presentan menor razón de teobromina/cafeína.



**Figura 16.** Diagrama de cajas para la relación teobromina/cafeína de las semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

Finalmente se correlacionó la variable cafeína y la razón teobromina/cafeína. Según la **Gráfica 1** encontramos materiales Criollos y Trinitarios con relación de teobromina/cafeína entre 2 y 8. Entre los cacaos Criollos se destaca el FLE 2 por presentar el valor de Cafeína más alta del grupo ( $> 4$ ), lo que le confiere la razón de teobromina/cafeína más baja ( $2 \leq$ ). Por otra parte el FTA 2 es el material que más se asemeja al cacao Forastero debido a la baja concentración de cafeína ( $2 <$ ) con proporción elevada de teobromina/cafeína ( $> 7$ ).



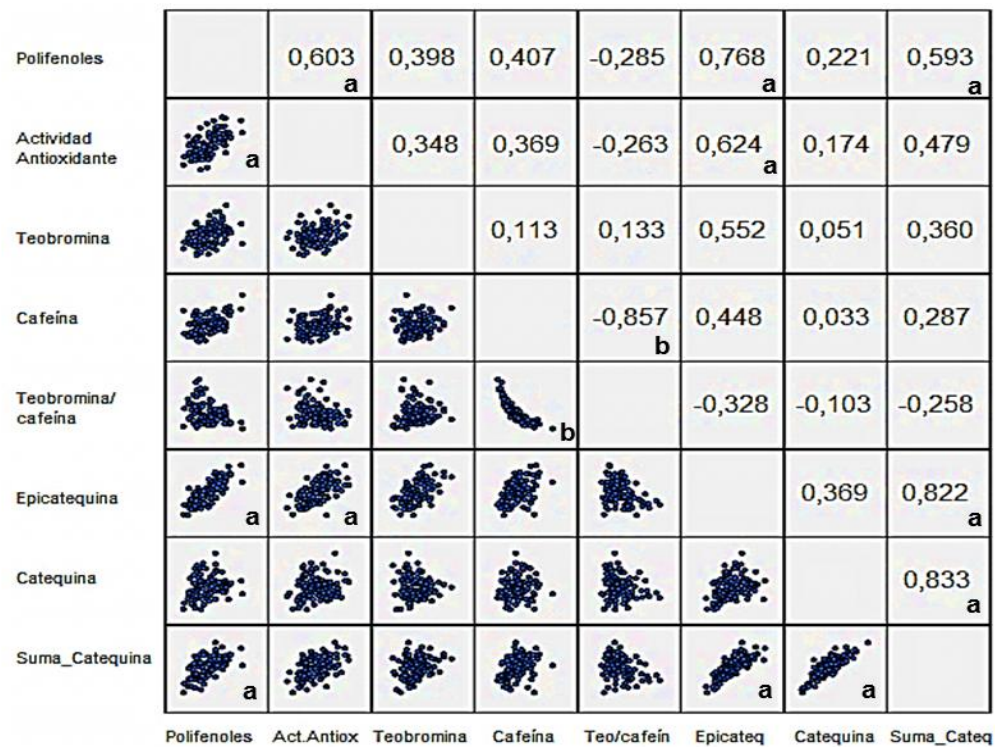
**Gráfica 1.** Relación entre el contenido de cafeína y la razón teobromina/cafeína en semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

### 3.6 CORRELACIÓN DE VARIABLES EVALUADAS

En este apartado se muestran los resultados del análisis de correlaciones lineales de Pearson ( $r$ ), seguido del análisis de componentes principales (**ACP**) y el análisis de conglomerados.

El tratamiento estadístico de los datos permitió demostrar la relación existente entre los distintos pares de variables del estudio, además logro describir el conjunto de mediciones realizadas a través de dos componentes principales y agrupar los materiales en tres grupos homogéneos con diferencias significativas.

**3.6.1 Análisis de correlaciones lineales.** En esta sección se muestran los coeficientes de correlación lineal de Pearson ( $r$ ) a través de una matriz [8 x 8] conformada por cada una de las variables contempladas en el estudio. Establecer el coeficiente de Pearson ( $r$ ) permitió conocer el grado de asociación lineal entre las diferentes variables. **(Gráfica 2).**



Las letras expresan diferencias significativas con nivel de confianza  $p \leq 0,05$ .

**Gráfica 2.** Dispersión matricial de las variables de estudio.

Los resultados de la dispersión matricial se clasifican según el coeficiente de Pearson en: correlaciones positivas **a** ( $0 < r < 1$ ) y correlaciones negativas **b** ( $-1 < r < 0$ ). Los resultados no comprenden correlaciones perfectas ( $r = -1$  o  $r = 1$ ). En la

**Tabla 11** se presentan los dúos de variables más significativos. Las gráficas se encuentran en el **ANEXO E**.

**Tabla 11.** Variables relacionadas con mayor correlación positiva (a) y negativa (b).

Variables	Coefficiente de Pearson
<b>(±)-Catequina con Catequinas totales</b> <sup>a.</sup>	<b><math>r = 0,833</math>.</b>
(-)-Epicatequina con Catequinas totales <sup>a.</sup>	$r = 0,822$ .
Polifenoles totales con (-)-Epicatequina <sup>a</sup>	$r = 0,768$ .
Actividad antioxidante con (-)-Epicatequina <sup>a.</sup>	$r = 0,624$
Polifenoles totales con Actividad antioxidante <sup>a</sup>	$r = 0,603$
Polifenoles totales con Catequinas totales <sup>a.</sup>	$r = 0,593$
<b>Teobromina/Cafeína con Cafeína</b> <sup>b.</sup>	<b><math>r = - 0,857</math></b>

Las letras expresan diferencias significativas con nivel de confianza  $p \leq 0,05$ .

Según la **Tabla 11** los dúos con el mayor grado de intimidad entre variables son: (±) – catequina con catequinas totales y teobromina/cafeína con cafeína, donde ambos presentan un coeficiente lineal fuerte ( $r > 0,7$  y  $r < -0,7$ ).

Los dúos con asociación moderada ( $r > 0,5$ ) son: polifenoles totales – (-)-epicatequina, actividad antioxidante – (-)-epicatequina y polifenoles totales con actividad antioxidante. Según lo anterior se destaca la (-)-epicatequina por ser el polifenol con mayor asociación entre las variables de interés.

Además se resalta la relación directa entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante, sin embargo su coeficiente de correlación es moderado ( $r = 0,603$ ) debido a la variabilidad encontrada en cada material respecto al contenido de: (-)-epicatequina, (±)-catequina, teobromina, y cafeína (**Sección 3.4 y 3.5**). Según lo anterior, Liebereiet *al.*, (2013) argumenta que los polifenoles descritos no poseen la misma capacidad antioxidante.

El único caso registrado con proporcionalidad inversa corresponde a teobromina/cafeína con cafeína, porque a valores altos de cafeína se obtienen valores bajos de teobromina/cafeína.

Por último es importante aclarar que un coeficiente lineal bajo ( $r < 0,3$ ) indica independencia entre las variables o se trata de una relación no lineal.

**3.6.2 Análisis de componentes principales.** En este apartado se presentan los resultados del Análisis de Componentes Principales (**ACP**), el cual permitió reducir la dimensión del conjunto de datos a través de nuevos componentes principales, productos de la combinación lineal de las variables originales.

Cada componente o factor se caracteriza por ser independiente de los demás, permitiendo agrupar los 21 materiales estudiados. A su vez, cada factor contempla las variables iniciales entorno al signo y magnitud de los coeficientes factoriales, con lo cual se logra explicar el mayor porcentaje de datos.

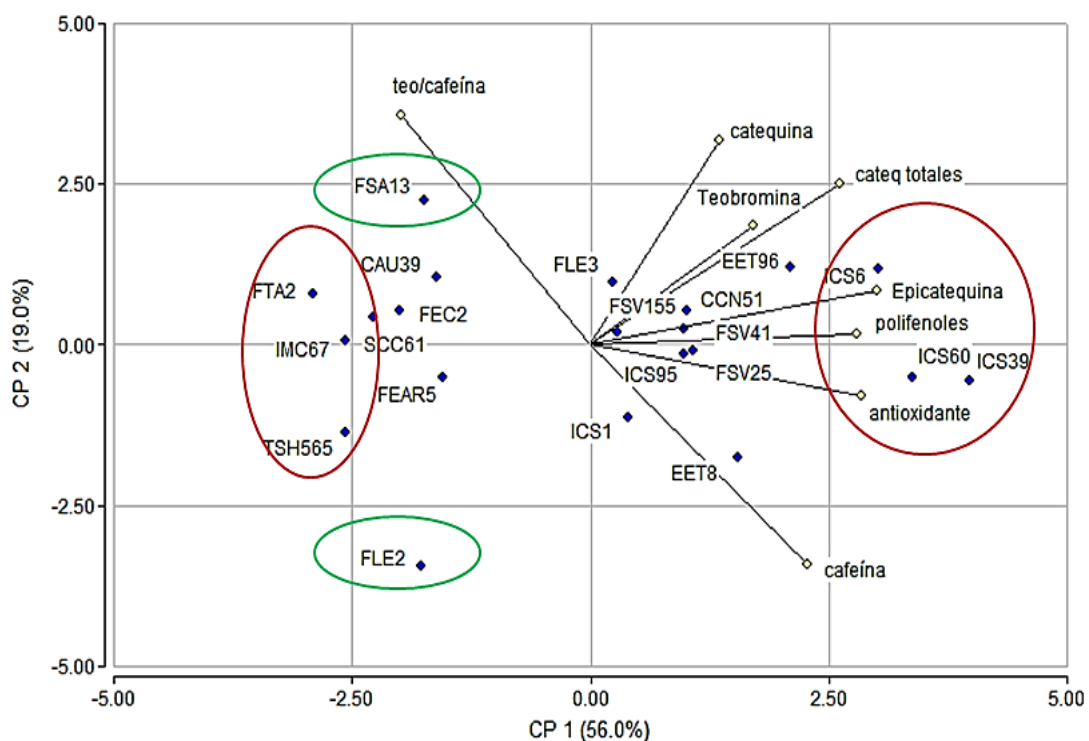
Los resultados para este estudio señalan que con tres componentes se logra explicar el 91% de la variabilidad observada entre variables, incluso dos componentes expresarían el 75%, como lo muestra la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Matriz de componentes principales.

Variable	Componente		
	1 (56%)	2 (19%)	3 (16%)
Polifenoles totales	<b>0,877*</b>	0,033	0,175
Actividad antioxidante.	<b>0,889*</b>	-0,143	0,243
Teobromina	0,535	0,341	<b>0,653*</b>
Cafeína	0,714	<b>-0,622*</b>	-0,133
Teobromina/Cafeína.	<b>-0,622*</b>	<b>0,654*</b>	0,374
(-)-Epicatequina	<b>0,942*</b>	0,153	0,180
(±)-Catequina	0,424	0,580	<b>-0,684*</b>
Catequinas totales.	<b>0,820*</b>	0,459	-0,331

Los valores expresan diferencias significativas con nivel de confianza  $p \leq 0,05$ .

Según la **Tabla 12** el primer componente (**CP 1**) describe el 56% de los datos a través de las variables: (-)-epicatequina, polifenoles totales, actividad antioxidante, catequinas totales y teobromina/cafeína, donde la última variable es inversamente proporcional a las demás. El segundo componente (**CP 2**) representa el 19% con la cafeína y la razón teobromina/cafeína, donde ambas son inversas como la teobromina y la ( $\pm$ )-catequina del tercer componente (**CP 3**), el cual asume el 16% restante. Según lo anterior se obtiene la **Gráfica 3a** a partir de los componentes **CP 1** en la abscisa y **CP2** en la ordenada.



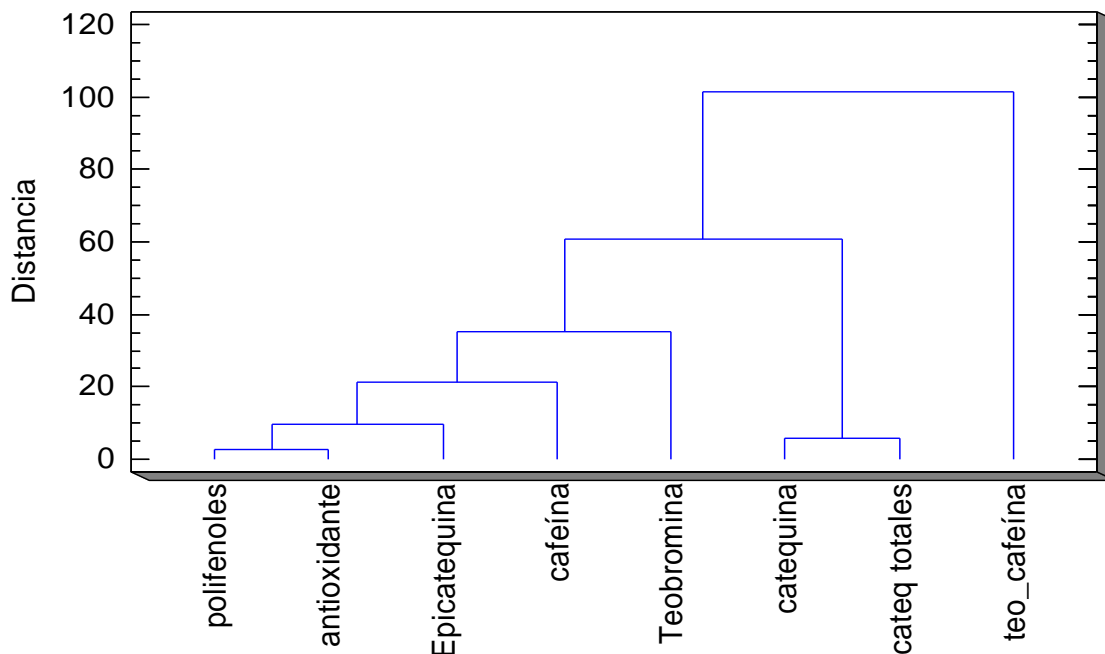
**Gráfica 3.** Diagrama de Componentes Principales (**ACP**) para las variables contempladas en el estudio de semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao.

En la gráfica anterior, CP 1 agrupa los materiales FTA 2, IMC 67, TSH 565, FEAR 5, SCC 61, FEC 2, y CAU 39, por presentar valores altos en la relación teobromina/cafeína y bajos respecto a las demás variables de CP 1. Además esta

componente destaca a los materiales ICS 39, ICS 60 e ICS 6 por contener el mayor contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante, (-)-epicatequina y catequinas totales.

Por otra parte CP 2 agrupa a los materiales FSA 13, FLE 3 y EET 96, por su alto contenido de teobromina/cafeína en comparación con el FLE 2, EET 8 e ICS 1, donde la cafeína es mayor. De acuerdo con lo anterior se señala que el índice de teobromina/cafeína es un criterio discriminante.

**3.6.3 Análisis de conglomerados.** El análisis de conglomerados (**Cluster**) se realizó en las variables (**Figura 17**), y en conjunto con los 21 materiales del estudio (**Figura 18**), con el propósito de formar grupos homogéneos internamente con diferencias estadísticas entre sí.

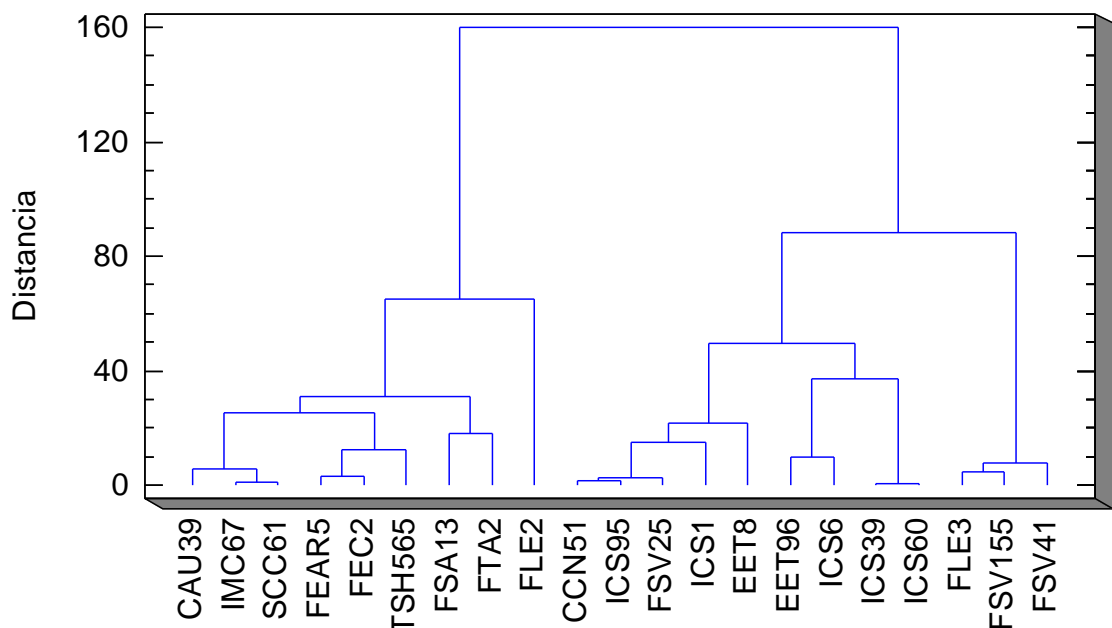


Clasificación realizada a partir del algoritmo de Ward y la distancia Euclidiana cuadrada.

**Figura 17.** Dendrograma con las ocho variables comprendidas en el estudio.

En el dendrograma de la **Figura 17**, se evidencia la formación de tres grupos principales: grupo **a**, conformado por las variables polifenoles totales, actividad antioxidante, (-)-epicatequina, cafeína y teobromina, grupo **b** constituido por ( $\pm$ )-catequina y catequinas totales. Por último la relación teobromina/cafeína constituye el grupo **c**.

En definitiva los agrupamientos de variables se convierten en una herramienta útil para definir, si es pertinente reducir el número de variables para efectuar análisis posteriores.



Clasificación realizada a partir del algoritmo de Ward y la distancia Euclidiana cuadrada.

**Figura 18.** Dendrograma con las ocho variables de referencia y los 21 materiales de estudio.

El dendrograma de la **Figura 18** permite observar las agrupaciones entre materiales análogos respecto a las ocho variables de referencia. Según el gráfico

los primeros en conglomerarse son: CCN 51 con ICS 95, ICS 39 con ICS 60, IMC 67 con SCC 61, FEAR 5 con FEC 2 y FLE 3 con FSV 155. Finalmente se obtienen tres asociaciones principales, sus características se exponen en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Conformación de tres conglomerados según el algoritmo de Ward.

Materiales		Variables	Media aritmética
<b>Cluster 1</b>			
CAU 39	TSH 565	Polifenoles totales	51,72 mg EAG/g <sub>ms</sub>
IMC 67	FSA13	Actividad antioxidante	1349,73 µM Trolox/g <sub>ms</sub>
SCC 61	FTA 2	Teobromina	9,66 mg/g <sub>ms</sub>
FEAR 5	FLE 2	Cafeína	2,01 mg/g <sub>ms</sub>
FEC 2		Teobromina/Cafeína	5,68
		(-)-Epicatequina	1,53 mg/g <sub>ms</sub>
		(±)-Catequina	0,95 mg/g <sub>ms</sub>
		Catequinas totales.	2,48 mg/g <sub>ms</sub>
<b>Cluster 2</b>			
CCN 51	EET 96	Polifenoles totales	65,61 mg EAG/g <sub>ms</sub>
ICS 95	ICS 6	Actividad antioxidante	1498,63 µM Trolox/g <sub>ms</sub>
FSV 25	ICS 39	Teobromina	10,90 mg/g <sub>ms</sub>
ICS 1	ICS 60	Cafeína	3,15 mg/g <sub>ms</sub>
EET 8		Teobromina/Cafeína	3,68
		(-)-Epicatequina	1,92 mg/g <sub>ms</sub>
		(±)-Catequina	1,09 mg/g <sub>ms</sub>
		Catequinas totales.	3,01 mg/g <sub>ms</sub>
<b>Cluster 3</b>			
		Polifenoles totales	56,44 mg EAG/g <sub>ms</sub>
		Actividad antioxidante	1380,35 µM Trolox/g <sub>ms</sub>
FLE 3		Teobromina	8,96 mg/g <sub>ms</sub>
FSV 155		Cafeína	2,88 mg/g <sub>ms</sub>
FSV 41		Teobromina/Cafeína	3,27
		(-)-Epicatequina	1,69 mg/g <sub>ms</sub>
		(±)-Catequina	1,50 mg/g <sub>ms</sub>
		Catequinas totales.	3,19 mg/g <sub>ms</sub>

Los valores expresan diferencias significativas con nivel de confianza  $p \leq 0,05$ .  
Clasificación realizada a partir del algoritmo de Ward y la distancia Euclidiana cuadrada.

Según la **Tabla 13**, los materiales CAU 39, IMC 67, SCC 61, FEAR 5, FEC 2, TSH 565, FSA 13, FTA 2 y FLE 2, conforman el Clúster con menor contenido de

polifenoles totales, actividad antioxidante y flavonoides, pero muestran el mayor valor de teobromina/cafeína del estudio.

Adicionalmente se destacan a los materiales CCN 51, ICS 95, FSV 25, ICS 1, EET 8, EET 96, ICS 6, ICS 39, e ICS 60, por conformar el grupo con mayor contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante, flavonoides y metilxantinas. Lo que permite señalarlos como materiales con alto potencial en el mercado de los productos funcionales.

Finalmente el FLE 3, FSV 155 y FSV 41 constituyen el grupo con valores intermedios de polifenoles totales, actividad antioxidante, flavonoides y metilxantinas.

### **3.7 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE OXÍGENO RADICAL DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE ICS 39 RESPECTO A OTROS ANTIOXIDANTES COMERCIALES**

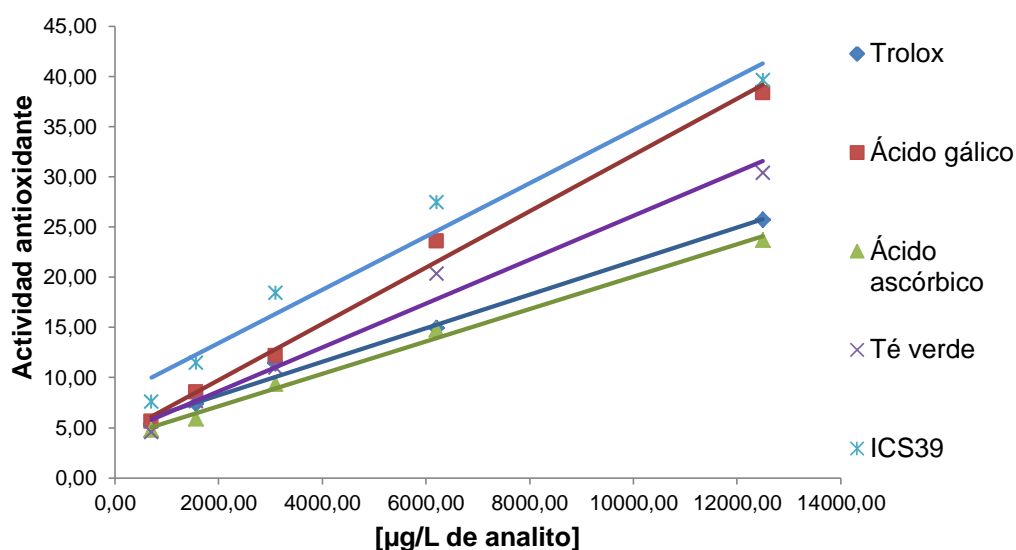
Al comparar el contenido de polifenoles y actividad antioxidante (ORAC) de los 21 materiales de cacao bajo estudio, se encontró que el extracto obtenido a partir de semillas de cacao sin fermentar del clon ICS 39, presenta los valores significativamente más altos para ambas variables (**Sección 3.2 y 3.3**). Por consiguiente, a partir del ICS 39 se obtuvo un extracto liofilizado rico en polifenoles, al cual se le midió la capacidad antioxidante (ORAC) y se comparó con la obtenida por el extracto liofilizado de té verde, ácido ascórbico, ácido gálico y Trolox.

En la **Tabla 14**, se muestran el área neta (**AUC**) y concentraciones contempladas para realizar el análisis de la capacidad antioxidante mostrada en la **Gráficas 4 y 5**.

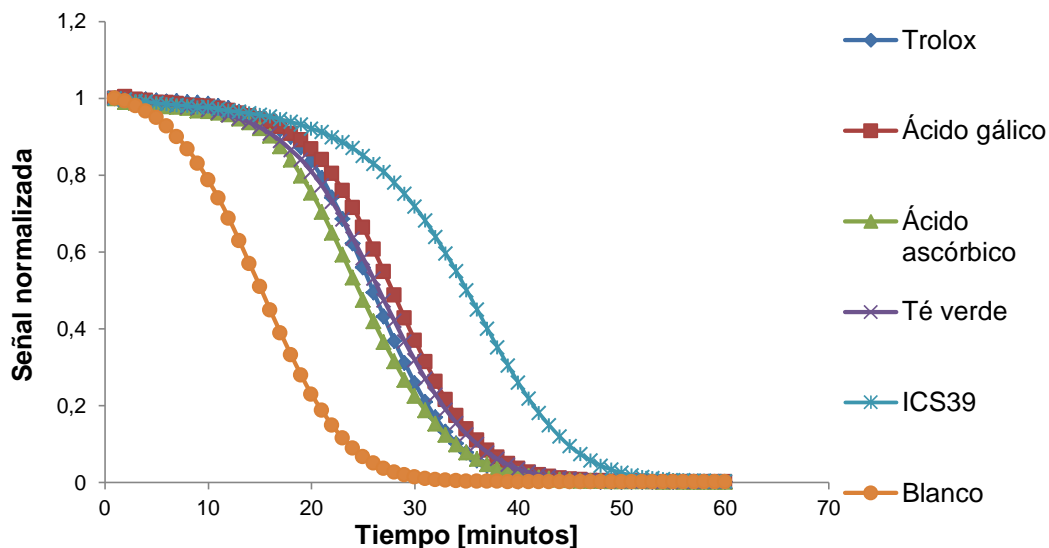
**Tabla 14.** Valores de área neta experimental de algunos patrones comerciales y de extractos liofilizados de Té verde e ICS 39.

[µg/L]	Trolox	Ácido gálico	Ácido ascórbico	Té verde	ICS39
700	5,29	5,61	4,77	4,53	<b>7,59</b>
1560	7,39	8,54	5,88	7,64	<b>11,47</b>
3100	11,38	12,17	9,34	10,97	<b>18,45</b>
6200	14,90	23,59	14,75	20,35	<b>27,44</b>
12500	25,71	38,35	23,68	30,41	<b>39,62</b>

Según la **Tabla 14**, el ICS 39, presentó la mayor **AUC** de todas las muestras evaluadas. El área neta corresponde a la diferencia entre el área de la fluorescencia bajo la curva de cada analito y el blanco. En la **Gráfica 4**, se muestran las curvas que permiten analizar la razón de cambio del área neta sobre la concentración de las muestras. El gráfico también indica que el ICS 39 presenta la mayor pendiente y por consiguiente la mayor capacidad antioxidante, mientras que el ácido ascórbico tiene la menor pendiente y el menor valor de capacidad antioxidante de las muestras evaluadas.



**Gráfica 4.** Correlación de la actividad antioxidante según las pendientes de patrones y extractos liofilizados.



**Gráfica 5.** Señal de decaimiento de la fluoresceína con respecto al tiempo de reacción para los extractos y sustancias bajo estudio a 3100  $\mu\text{g/L}$ .

En la **Gráfica 5** la señal que representa la mayor área bajo la curva corresponde al ICS 39, lo cual significa que los antioxidantes presentes en este extracto liofilizado protegen la molécula de fluoresceína de la degeneración oxidativa, a través de la formación de enlaces entre los átomos de hidrogeno de los compuestos antioxidantes del extracto y los radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) generados por el AAPH, dando origen a hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ) y radicales antioxidantes estables (**Figura 6**) (Huanget *al.*, 2002; Ouet *al.*, 2001).

Por tanto la capacidad de absorción de radicales peroxilo del ICS 39 es superior al extracto de té verde, a las sustancias biológicamente importantes como la vitamina C (Ácido ascórbico), y a los antioxidantes analíticos (Trolox, Ácido gálico) utilizados como patrones en la cuantificación de actividad antioxidante (ORAC).

El té verde ha sido objeto de varios estudios debido a sus efectos positivos sobre la salud y surelación con el contenido de antioxidantes (Tanget *al.*, 2009; Thielecke y Boschmann, 2009). Este producto natural es muy comercializado

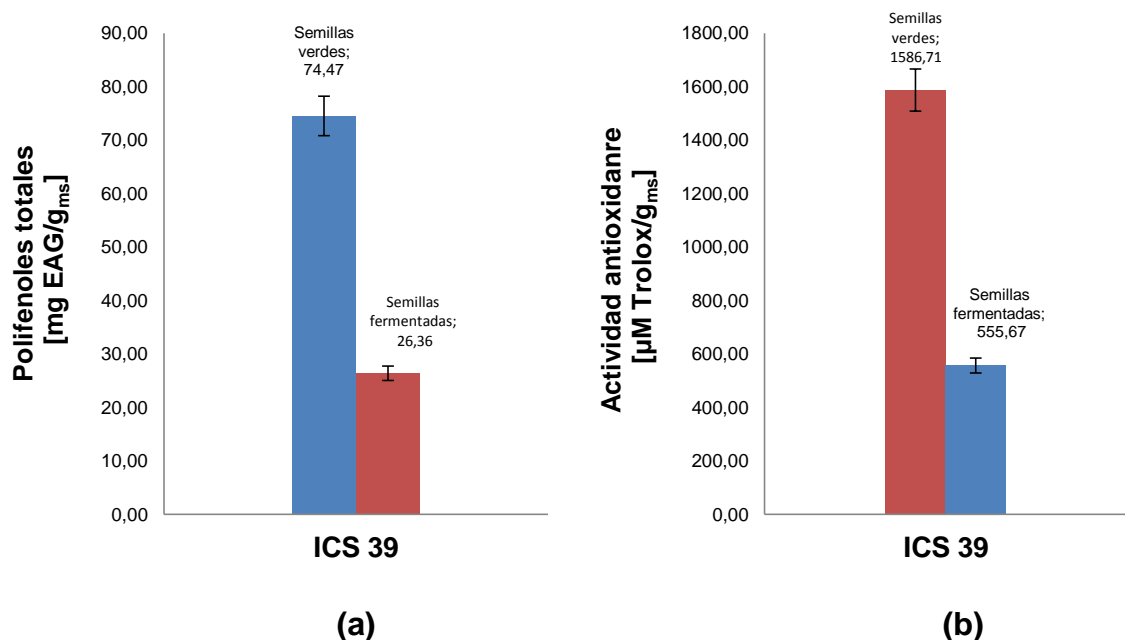
actualmente en la industria farmacéutica por sus atributos funcionales (Coreyet *al.*, 2011).

Por otra parte, las semillas de cacao sin fermentar actualmente son objeto de interés de investigadores y la industria farmacéutica, quienes recientemente han comenzado a comercializar productos naturales con alto contenido de flavonoides presentes en el cacao como **cocoanOX®**, producido por la industria Española NATRACEUTICAL© (Cienfuegos *et al.*, 2009).

Los resultados del presente estudio señalan al ICS 39 por su capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales, como material de interés para el desarrollo de productos farmacéuticos. Además es importante indicar que los materiales con buenos atributos funcionales contienen perfiles sensoriales con alto sabor amargo y astringente, lo cual no resulta ser positivo para la industria de la confitería (Schinella *et al.*, 2010).

### **3.8 EFECTO DEL BENEFICIO DEL GRANO DE ICS 39 SOBRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

En vista de que el manejo postcosecha del grano conduce a la pérdida de atributos funcionales y a la disminución de la capacidad antioxidante de los materiales; en este apartado se comparan los resultados de polifenoles totales y la actividad antioxidante de semillas secas sin fermentar y semillas bien fermentadas de ICS 39 (**Figura 19**). Los resultados de las semillas bien fermentadas pertenecen a la base de datos del CICTA (2013).



**Figura 19.** Contenido de polifenoles totales (a) y capacidad antioxidante (b) en granos fermentados y sin fermentar de ICS 39.

Los resultados muestran que el contenido de polifenoles totales se reduce en un 64,60% y la capacidad antioxidante disminuye en un 64,97% después del proceso de beneficio del grano. Investigaciones realizadas por Misnawiet *al.*, (2002) han demostrado también disminuciones desde 30% hasta el 65% en el contenido de polifenoles totales en semillas de cacao. Azizahet *al.*, 2007 encontró disminuciones del 50%. Estos estudios concluyen que la disminución depende principalmente de la variabilidad genética, el origen y altitud del cultivo (Carrillo *et al.*, 2013).

Finalmente el alto contenido de polifenoles totales del ICS 39 puede aprovecharse para ser utilizado en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos, en vez de someterse a procesos de beneficio que requiere la industria de la confitería.

## CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias significativas entre los 21 materiales estudiados, lo que permitió su agrupación y facilita la selección de acuerdo a las características funcionales.

Se destacan a los materiales CCN 51, ICS 95, FSV 25, ICS 1, EET 8, EET 96, ICS 6, ICS 39, e ICS 60, por conformar el grupo con mayor valor de polifenoles totales, actividad antioxidante, teobromina, cafeína, y (-)-epicatequina; lo que permite señalarlos como materiales con amplio potencial en el mercado de los productos funcionales.

Los resultados encontrados demuestran que Colombia cuenta con materiales de excelente calidad como el ICS 39 y FSV 25, para la comercialización y desarrollo de productos funcionales.

El extracto liofilizado de ICS 39 mostró una elevada actividad antioxidante sobre los radicales peroxilo, superando a todos los antioxidantes evaluados, y al extracto de té verde.

## RECOMENDACIONES

Involucrar la comercialización de semillas de cacao secas sin fermentar como nueva alternativa de mercado, con el propósito de aprovechar las características funcionales de los materiales más cultivados del país.

Desarrollar fórmulas de suplementos dietarios enriquecidos con antioxidantes a partir de los materiales más ricos en polifenoles como el ICS 39 e ICS 60, con el propósito de explotar los beneficios de estos compuestos sobre la salud.

Realizar estudios específicos de caracterización de flavan-3-ol para los materiales con mayor contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante.

## BIBLIOGRAFÍA

ABRIL M., CLADERA M., PÉREZ F., CASTELLOTEA C., FRANCHA A., CASTELL A M. A diet enriched with cocoa prevents IgE synthesis in a rat allergy model. *Pharmacological Research*. **2012**, 65, 603– 608.

ADAMSON G., LAZARUS S., MITCHELL M., PRIOR R., CAO G., JACOBS H., KREMERS H., HAMMERSTONE J., RUCKER R., RITTER R., SCHMITZ H. HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4184-4188.

AFOAKWA E. *Chocolate science and technology*. Willey-Blackwell. York, United Kingdom, **2010**, 1-33.

AMORES F., PALACIOS A., JIMÉNEZ A., ZHANG D. Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del cacao en el nor-oriente de la provincia de Esmeraldas. *INIAP boletín técnico* 135. **2009**. Recuperado de <http://www.procitropicos.org.br/portal/newbb/viewpost.php?viewmode=compact&order=ASC&forum=10>.

AZIZAH O., AMIN I., NAWALYAH A., ILHAM A. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*. **2007**, 100, 1523-1530.

AZIZAH H., RUSLAWATI N., SWEE T. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*. **1999**, 64, 199-202.

BELSCAK A., KOMES D., HORZIC D., KOVACEVIC K., KARLOVIC D. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*. **2009**, 42, 707–716.

BERTAZZO A., COMAI S., BRUNATO I., ZANCATO M., COSTA C. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. *Food Chemistry*.**2011**, 124, 93–96.

BERTAZZO A., COMAI S., MANGIARINI F., CHEN S. *Chocolate in Health and Nutrition*. Humana press. Berlin. Germany. **2013**, 7, 105-117.

BORCHERS A., KEEN C., HANNUM S., GERSHWIN M. Cocoa and Chocolate: Composition, Bioavailability, and Health Implications. *Journal of Medicinal Food*.**2000**, 3, 77-105.

BRUNETTO M., GUTIÉRREZ L., DELGADO Y., GALLIGNANI M., ZAMBRANO A., GOMEZ A., RAMOS G., ROMEROET C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*.**2007**, 100, 459 – 467.

BUITRAGO-LOPEZ A., SANDERSON J., JOHNSON L., WARNAKULA S., WOOD A., DI ANGELANTONIO E., et al. Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ*.**2011**, 343, d4488.

CARRILLO L., LONDOÑO J., GIL A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*. **In Press**. doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.019.

CIENFUEGOS-JOVELLANOS E., QUIÑONES M., MUGUERZA M., MOULAY L., MIGUEL M., ALEIXANDRE A. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.**2009**, 57, 6156-6162.

CORCUERA L., AMÉZQUETA S., ARBILLAGA L., VETTORAZZI A., TOURIÑO S., TORRES J., LÓPEZ A.A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*.**2012**, 50, 989–995.

COREY M., KERR W., MULLIGAN J., LAVELLIV..Phytochemical stability in dried apple and green tea functional products as related to moisture properties. *Food Science and Technology*.2011, 44, 67-74.

CORTI R., FLAMMER AJ., HOLLENBERG NK., LUSCHER TF. Cocoa and cardiovascular health.*Circulation*.**2009**, 119, 1433-4.

DAVRIEUX F., ASSEMAT S., BOULANGER R., & CROS E. (2004).Determination of cocoa purine content by near infrared spectroscopy. En S. Essomba (Presidencia), *XIV International Conference of Investigation of the Cocoa*, Ghana, Acra, Ghana.

EL TIEMPO. Cacacoteros en Santander piden 'cacao' por crisis del sector. En línea, [http://www.eltiempo.com/colombia/oriente/ARTICULO-WEB-NEW\\_NOTA\\_INTERIOR-12028892.html](http://www.eltiempo.com/colombia/oriente/ARTICULO-WEB-NEW_NOTA_INTERIOR-12028892.html), consultado el 16 de Julio del **2013**.

EI UNIVERSAL. Crisis cacaotera deja \$30.000 millones en pérdidas. En línea, <http://www.eluniversal.com.co/cartagena/economica/crisis-cacaotera-deja-30000-millones-en-perdidas-83969>, consultado el 16 de Julio del **2013**.

ELWERS S., ZAMBRANO A., ROHSIUS C., LIEBEREI R., Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao L.*). *Eur Food Res Technol*. **2009**, 229, 937–948.

GOTTI R., FURLANETTO S., PINZAUTI S., CAVRINI V. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellarelectrokinetic chromatography.*Journal of Chromatography*.**2006**, 1112, 345–352.

GU L., HOUSE Z., WU X., OU B., PRIOR R. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4057-4061.

HII C., LAW C., SUZANNAH S., MISNAWI C., CLOKE M. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *As. J. Food Ag-Ind.* **2009**, 2, 702-722.

HUANG D., Ou B., HAMPSCH-WOODILL M., FLANAGAN J., PRIOR R. 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.***2002**, 50, 4437-4444.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION ICCO. The world cocoa economy: past and present. *One hundred and forty-sixth meeting London.***2012**, 18-21.

JONFIA-ESSIEN W., WEST G., ALDERSON P., TUCKER G., Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry.***2008**, 108, 1155–1159.

LATIF R. Chocolate/cocoa and human health: a review. *Neth J Med.* **2013**, 71(2), 63-8.

LIEBEREI R., KADOW D., SEIGLER D. *Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.**2013**, 5, 1599-1616.

MARTIN M., GOYA L., RAMOS S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and chemical toxicology.***2013**, 56, 336–351.

MATTIA C., MARTUSCELLI M., SACCHETTI G., SCHEIRLINCK I., BEHEYDT B., MASTROCOLA D., PITTIA P. Effect of Fermentation and Drying on Procyanidins, Antiradical Activity and Reducing Properties of Cocoa Beans. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, DOI: 10.1007/s11947-012-1028.

MARTÍNEZ R., TORRES A., MENESES M., FIGUEROA A., PÉREZ-ÁLVAREZ J., VIUDA-MARTOS B. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International* .**2012**, 49, 39–45.

MERKEN., H y BEECHER., G. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. FoodChem.* **2000**, 48, 577-5799.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL (MADR). Boletín de análisis por producto: Cacao. *Boletín No 4*, **2010**.

MISNAWI J., BAKAR J., SAARI N. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *J. ScifoodAgric.* **2002**, 82, 559-556.

NATRASEUTICAL GROUP. En línea <http://www.natraceuticalgroup.com/natraceutical-quienes-somos.html>, consultado el 16 de Julio del **2013**.

NAZARUDDIN R., SENG L., HASSAN O., SAID M. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products.***2006**, 24, 87–94.

NIEMENAK, N., ROHSIUS, C., ELWERS, S., NDOUMOU, D., LIEBEREI, R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis.***2006**, 19, 612-619.

OLEAGA C., GARCIA M., SOLE A., CIUDAD C., IZQUIERDO-PULIDO M., NOE V., CYP1A1 is overexpressed upon incubation of breast cancer cells with a polyphenolic cocoa extract. *Eur J Nutr.***2012**, 51, 465–476.

ONWULATA C. *Encapsulated and powdered foods*. CRC press LLC. Boca Raton, Florida, **2005**. 452-473.

OSMAN H., NASARUDIN R., LEE S. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chemistry*. **2004**, 84, 41–46.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL M., PRIOR R. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. FoodChem.* **2001**, 49, 4619-4626.

PEREA, J., VILLAMIZAR, A., RAMÍREZ, O. Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*. **2011**, 9, 35 – 42.

PEREA, J., CADENA T., HERRERA J. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*. **2009**, 41, 128-134.

PEREA J., CADENA T., ARANZAZU F., MARTINEZ N. *características de calidad del cacao de Colombia, catálogo de 26 cultivares*. Publicaciones UIS, Bucaramanga, Colombia. **2013**.

PHILLIPS W., ADRCINIEGAS A., MATA A., MOTAMAYOR J. *Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembra*. CATIE. Turrialba, Costa Rica, **2012**, 1, 60-70.

PRIOR, R., WU, X., SCHAICH K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. **2005**. 53. 4290-4302.

QUIÑONES M., MIGUEL A., MUGUERZA B., ALEIXANDREA D. Effect of a cocoa polyphenol extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* **2011**, 2, 649.

RAMIREZ I., MAYA L., CEBALLOS G., VILLARREAL F. Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison

with Folin–Ciocalteu method. *Journal of Food Composition and Analysis*.**2010**, 23, 790–793.

SCHEMAN A. Adverse reactions to cosmetics ingredients. *Dermatologic Clinics*, **2000**, 18, 685-689.

SCHINELLA G., MOSCA S., CIENFUEGOS E., PASAMAR M., MUGUERZA B., RAMÓN D., RÍOS J. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*.**2010**, 43, 1614–1623.

SINGLETON, V., ORTHOFER, R., ROSA M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods In Enzymology*. **1999**. 299. 152-179.

SINGLETON, V., ROSSY, J. Colorimetric of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *America Journal of Enology and Viniculture*.**1965** 16, 144-158.

TANG N., WU Y., ZHOU B., WANG B., YU R. Green tea, black tea consumption and risk of lung cancer: A meta-analysis. *Lung Cancer*.**2009**, 65, 274–283.

THIELECKE F Y BOSCHMANNM. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – A review. *Phytochemistry*.**2009**, 70, 11–24.

TOMAS-BARBERN F., CIENFUEGOS E., MARN A., MUGUERZA B., GIL A., CERD B., ZAFRILLA P., MORILLAS J., MULERO J., IBARRA A., PASAMAR M., RAMN D., ESPN J. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoids monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J. Agric. Food Chem*. **2007**, 55, 3926-3935.

VERMERRIS., W y NICHOLSON., R. *Phenolic compound biochemistry*; Springer, New York, EE.UU., **2008**, 1-24.

WACKERLY D., MENDENHALL W., SCHEAFFER R. *Estadística matemática con aplicaciones*, Séptima Edición. Thomson/Brooks-Cole. México, D.F. **2008**.

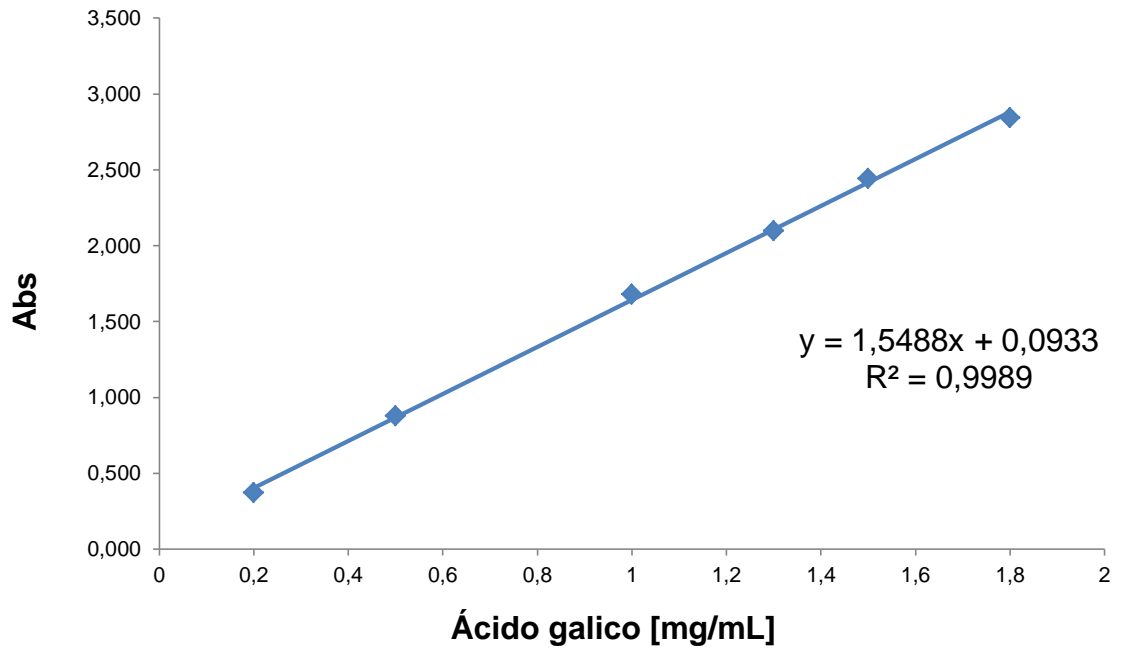
WOLLGAST J., ANKLAM E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*.**2000**, 33, 423-447.

WU, X., BEECHER, G., HOLDEN, J., HAYTOWITZ, D., GEBHARDT, S., PRIOR, R. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States.*J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4026-4037.

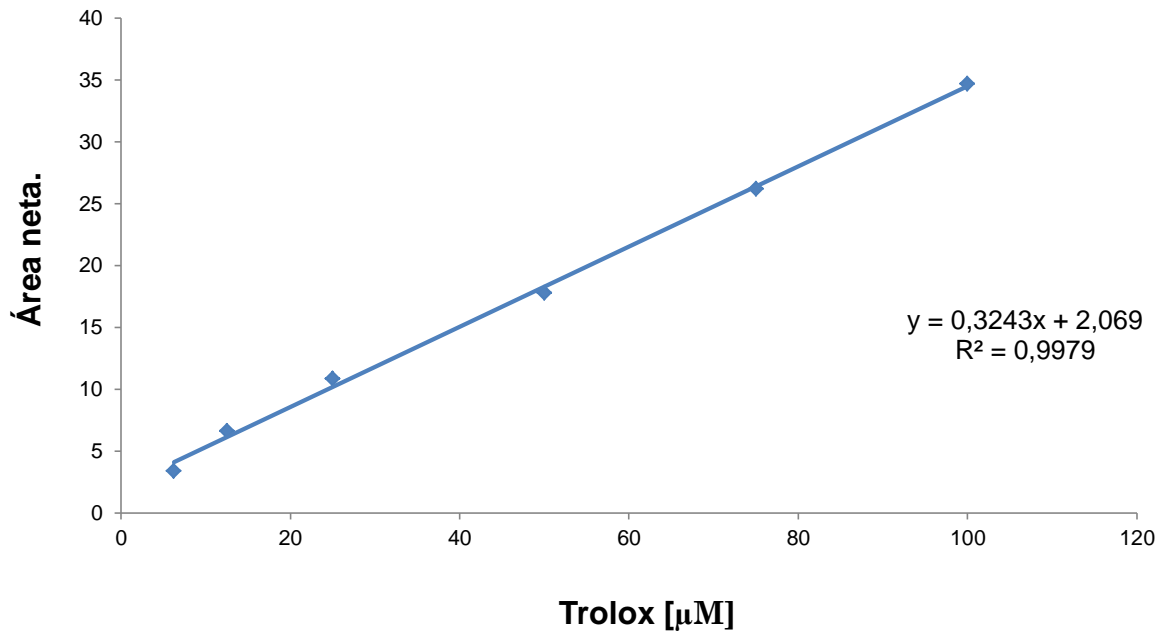
ZOMER E., OWEN A., MAGLIANO D., LIEW D., REID C. The effectiveness and cost effectiveness of dark chocolate consumption as prevention therapy in people at high risk of cardiovascular disease: best case scenario analysis using a Markov model. *BMJ*. **2012**, 344, 1-9.

## **ANEXOS**

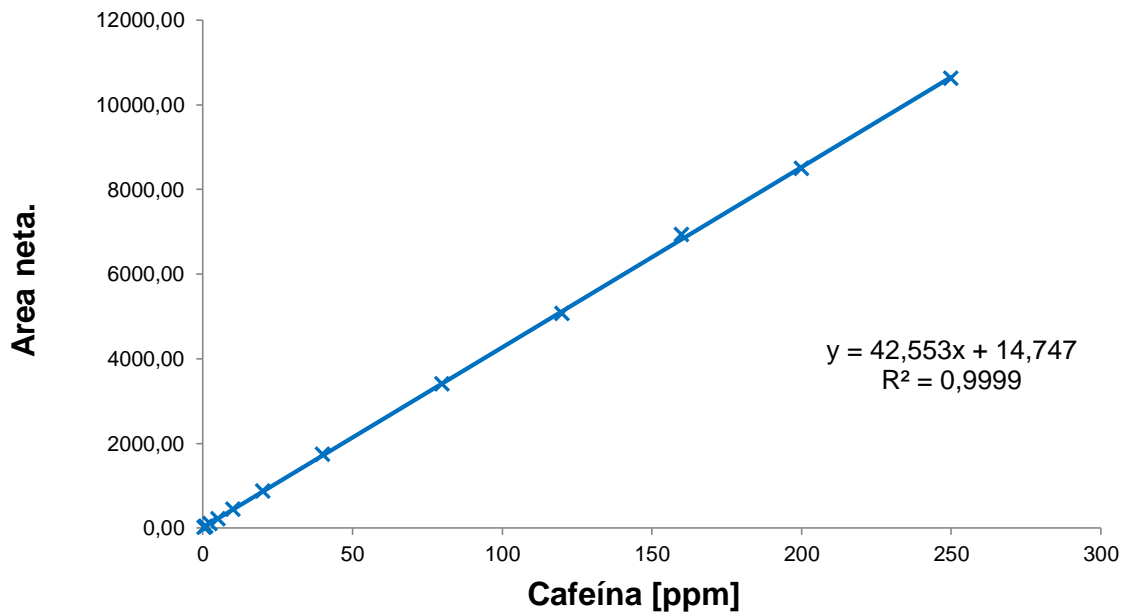
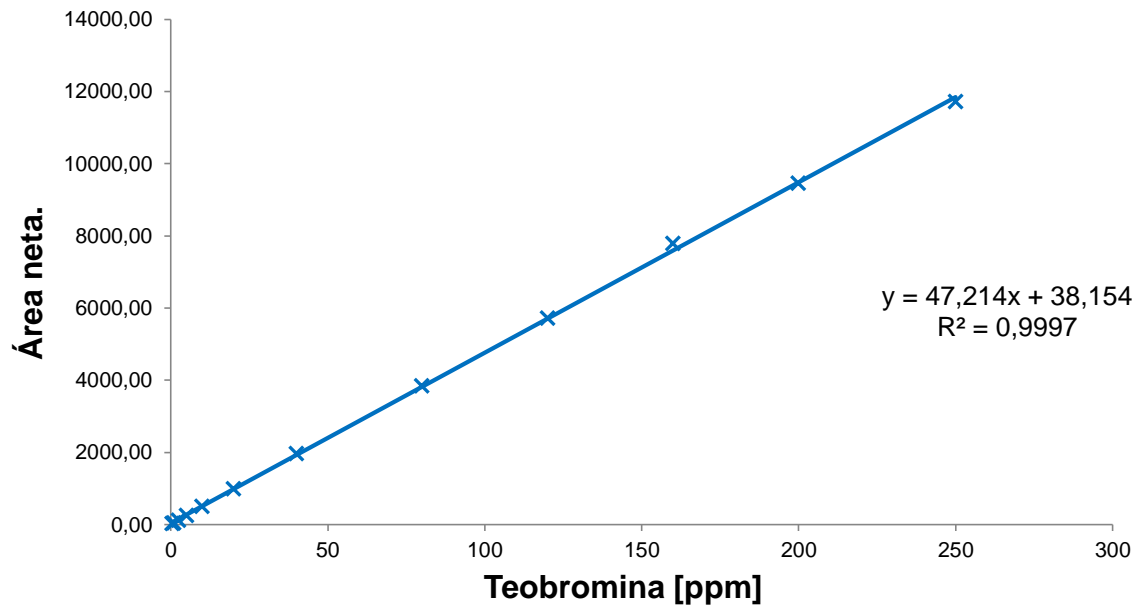
**ANEXO A.** Curva de calibración para la medición de polifenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu.

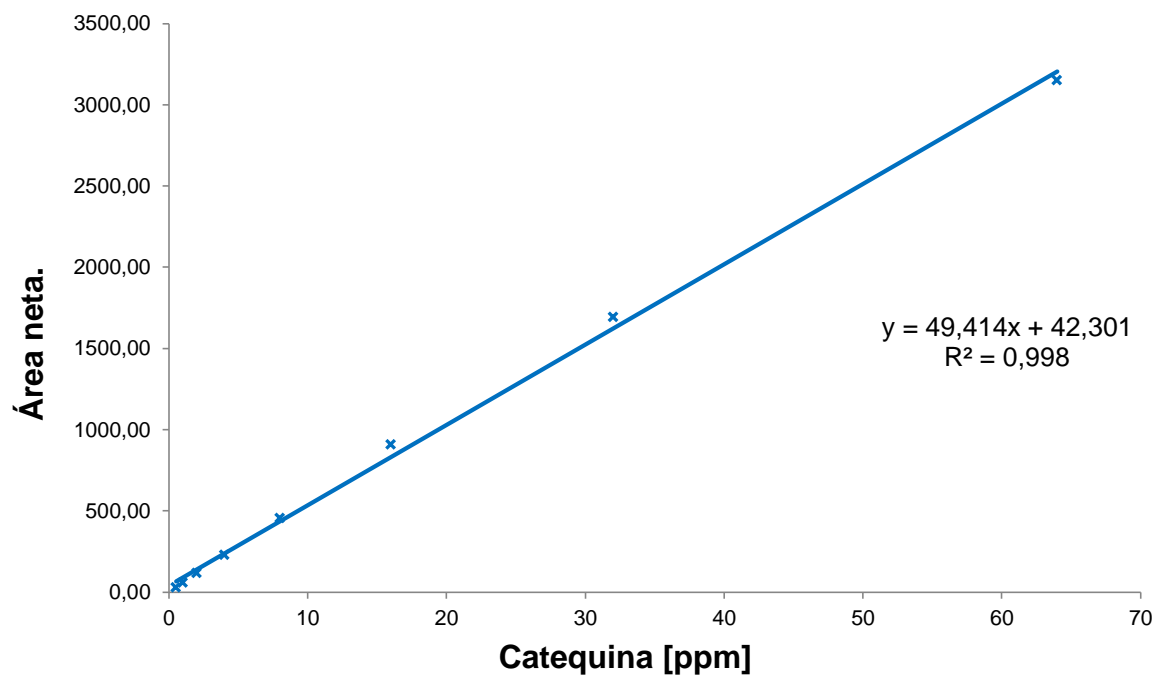
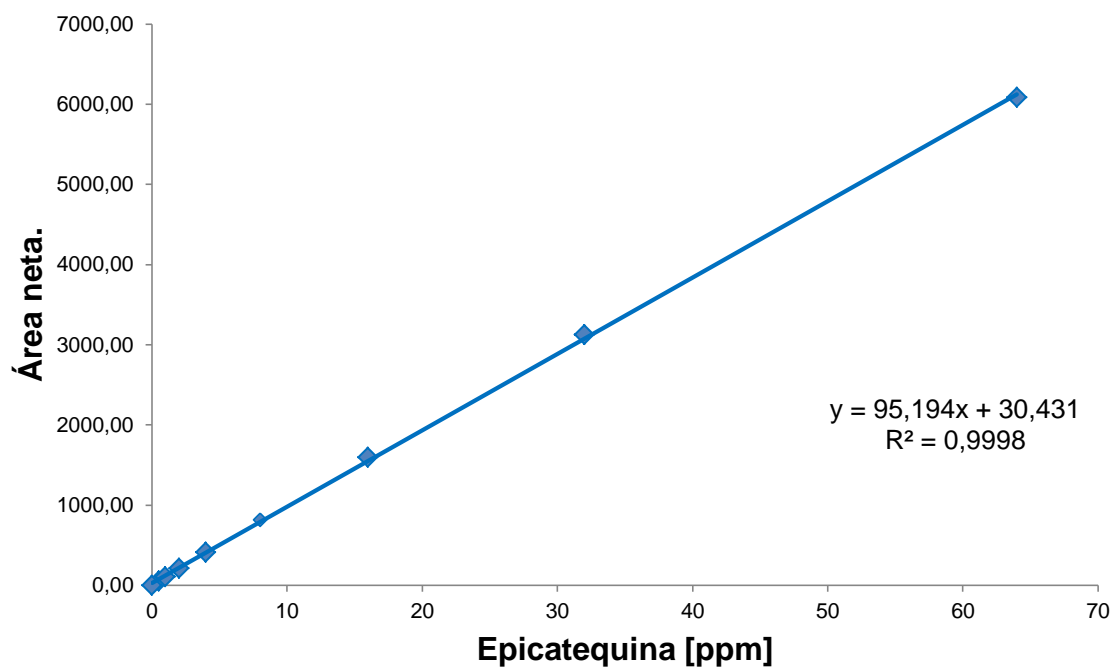


**ANEXO B.** Curva de calibración para la medición de la actividad antioxidante por el método de ORAC.



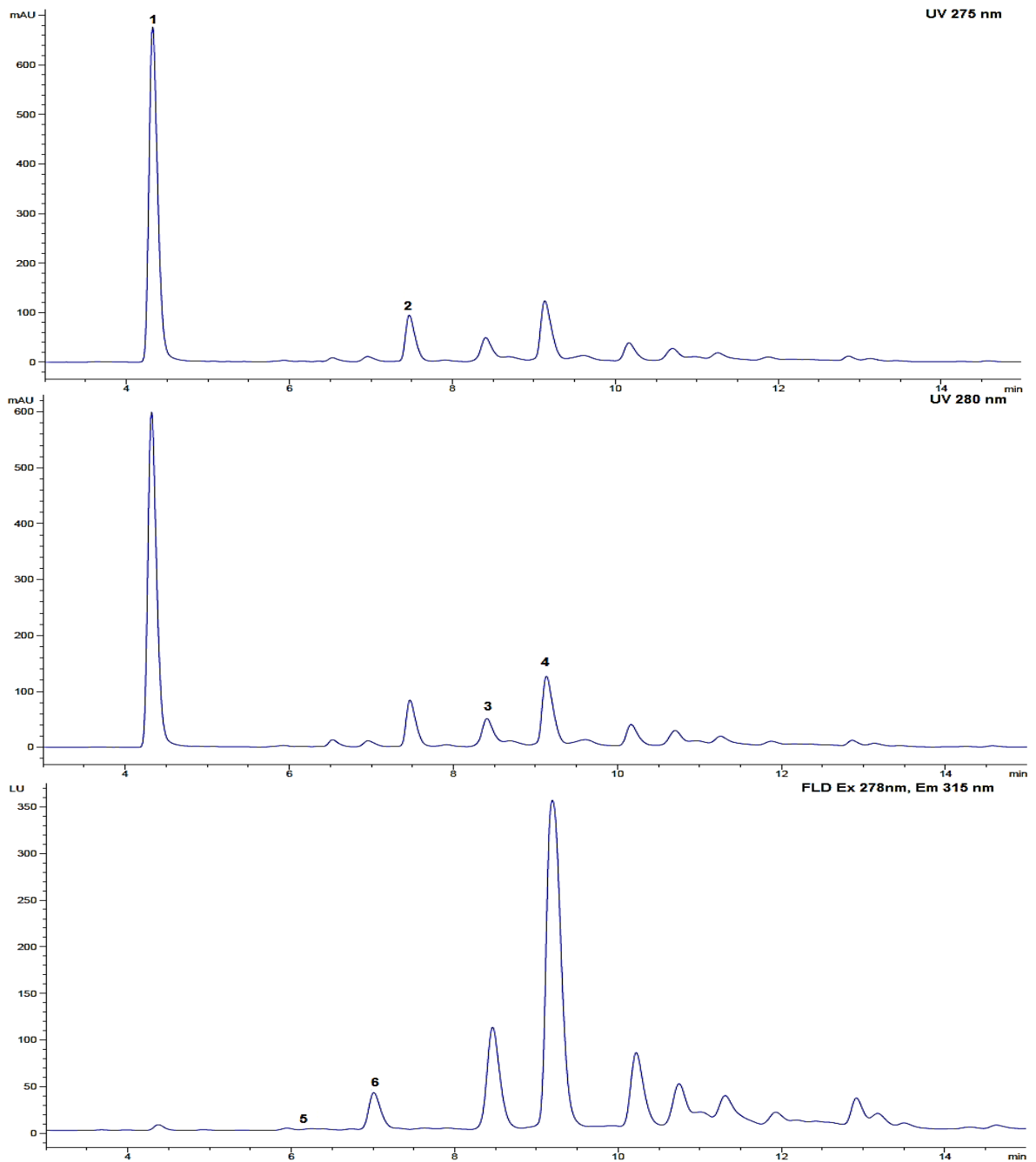
**ANEXO C.** Curvas de calibración de Teobromina, cafeína, (-)-epicatequina, (±)-catequina.



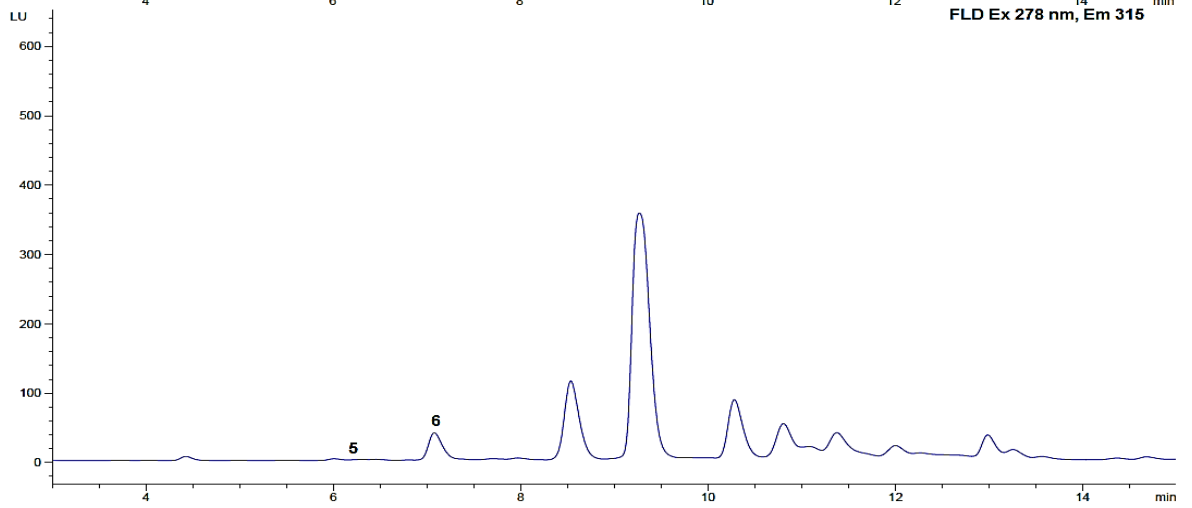
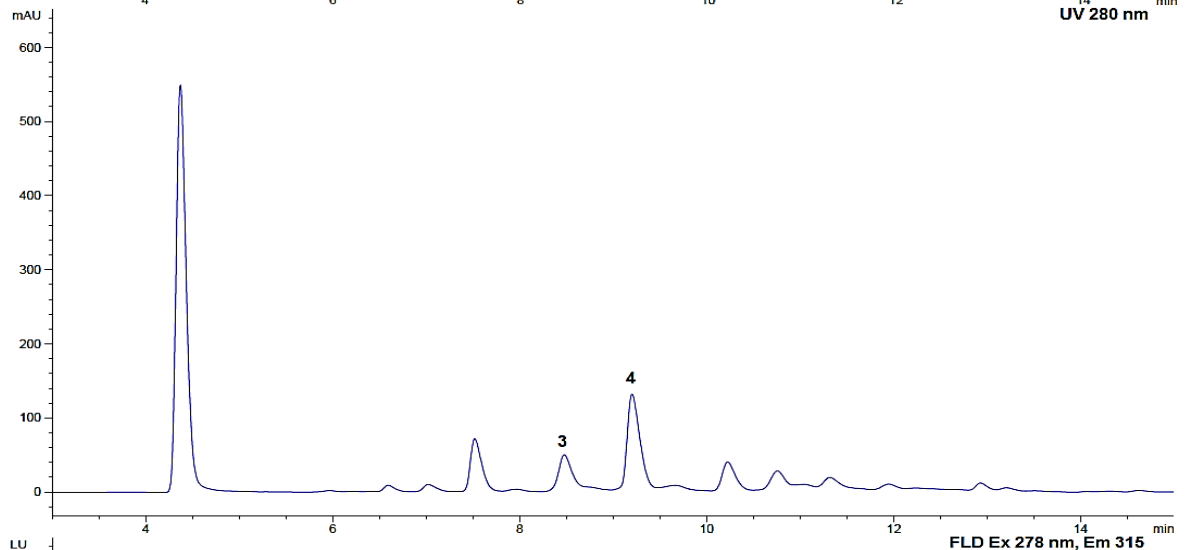
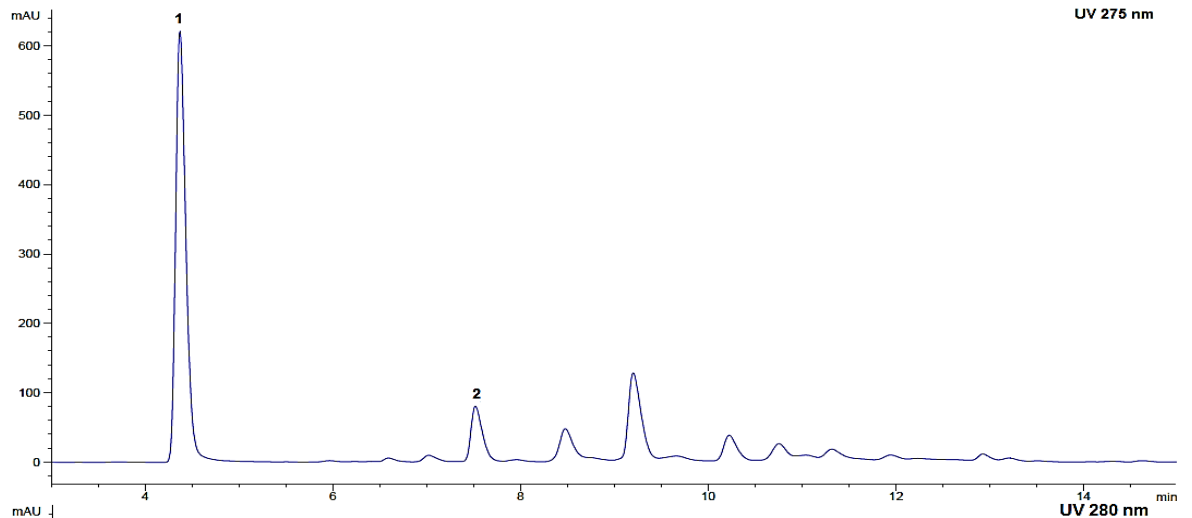


**ANEXO D.** Cromatogramas de extractos de semillas sin fermentar de 21 materiales de cacao. Donde 1. Teobromina, 2. Cafeína, 3. Procianidina B2, 4. (-)-Epicatequina, 5. Procianidina B1 y 6. (±)-Catequina.

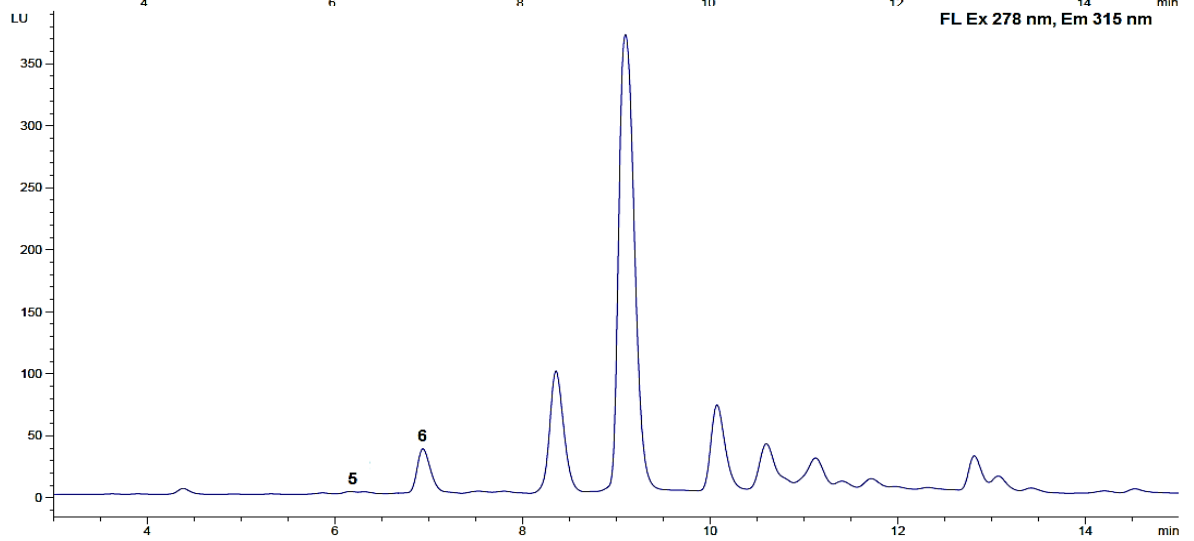
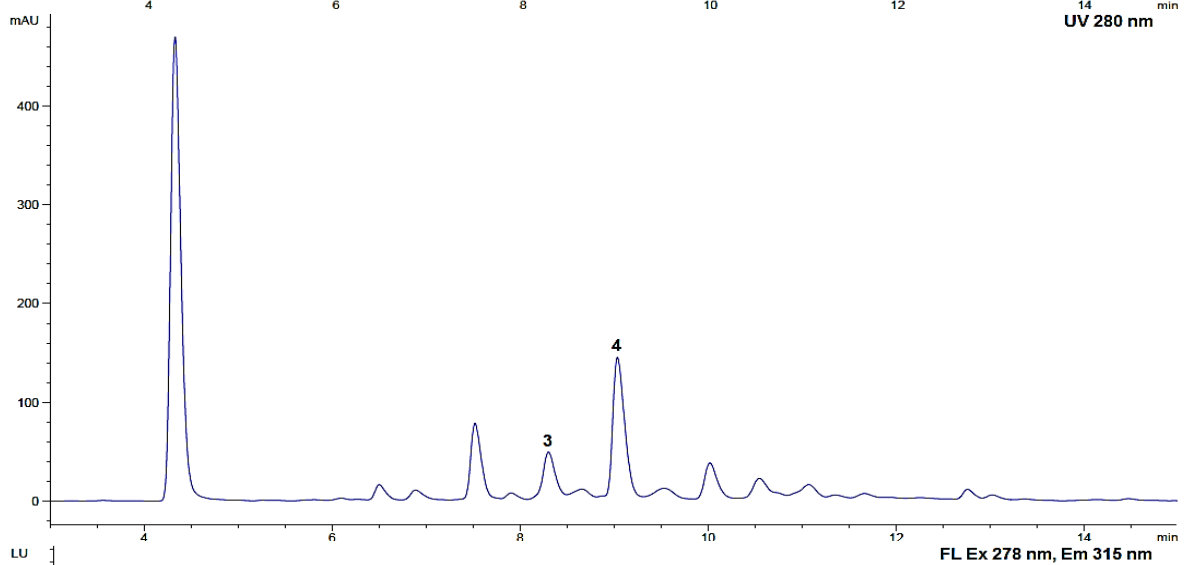
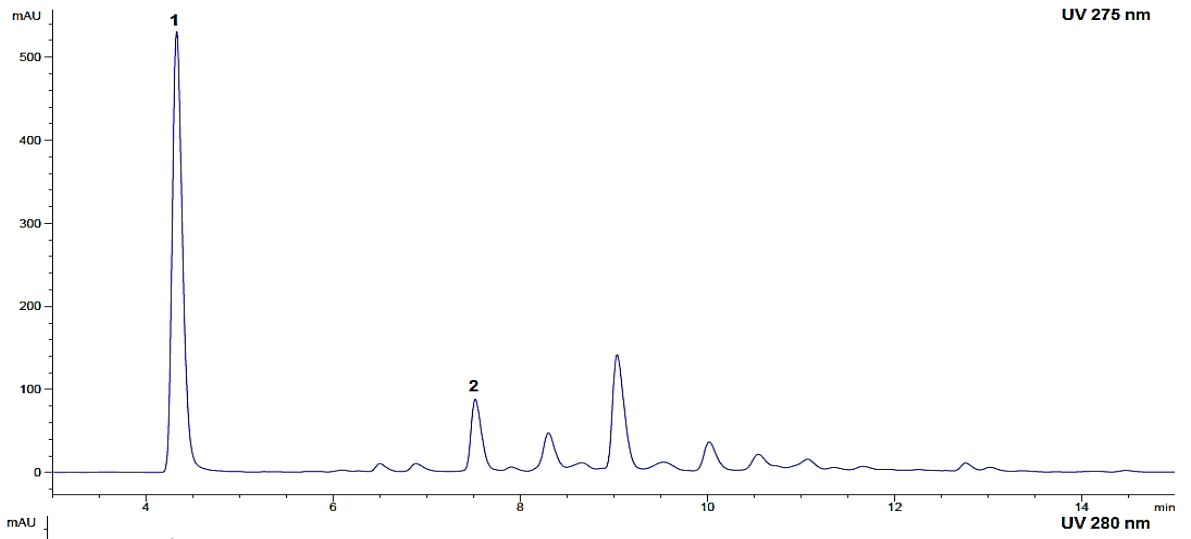
**CAU 39**



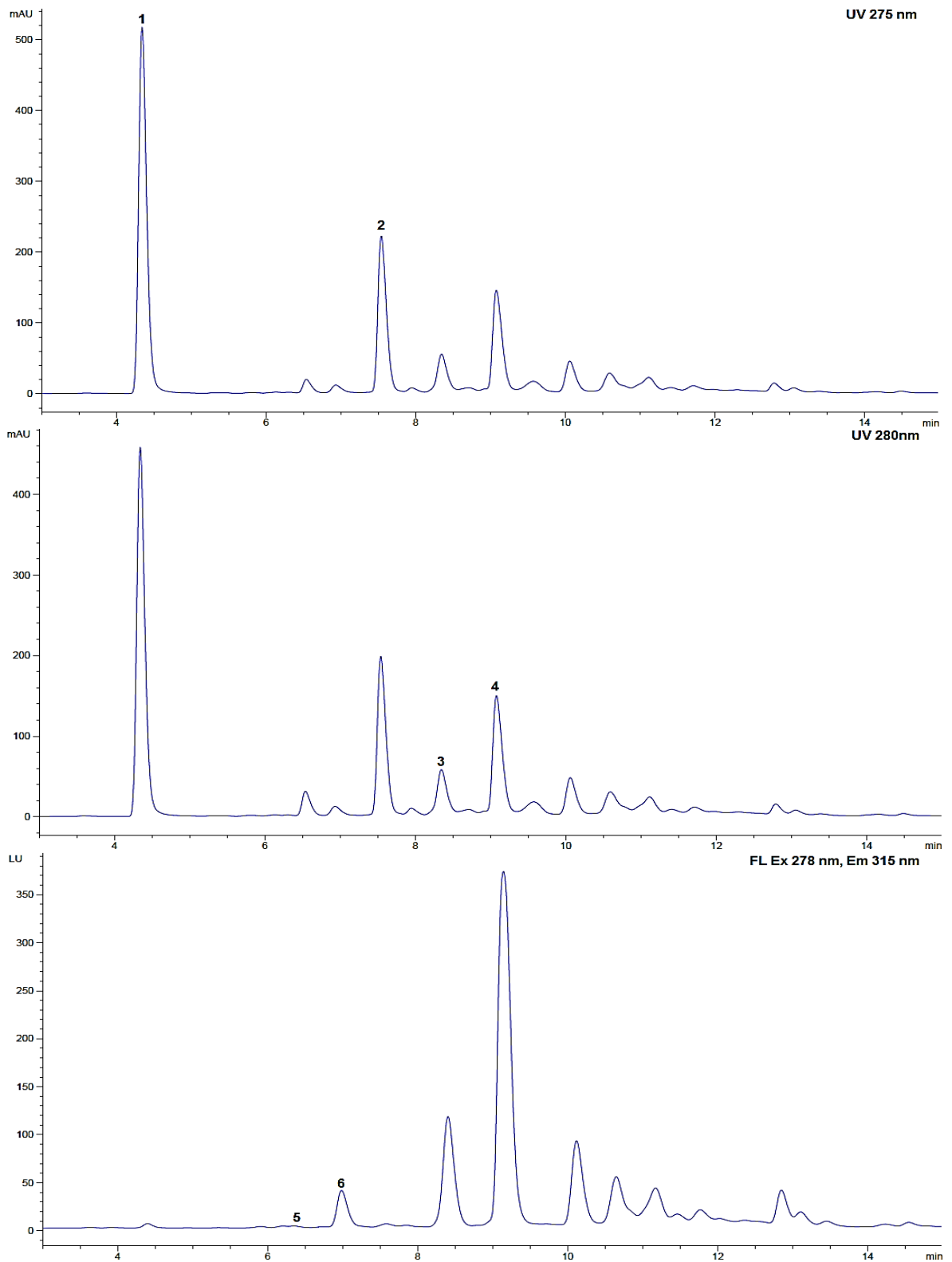
# FEAR 5



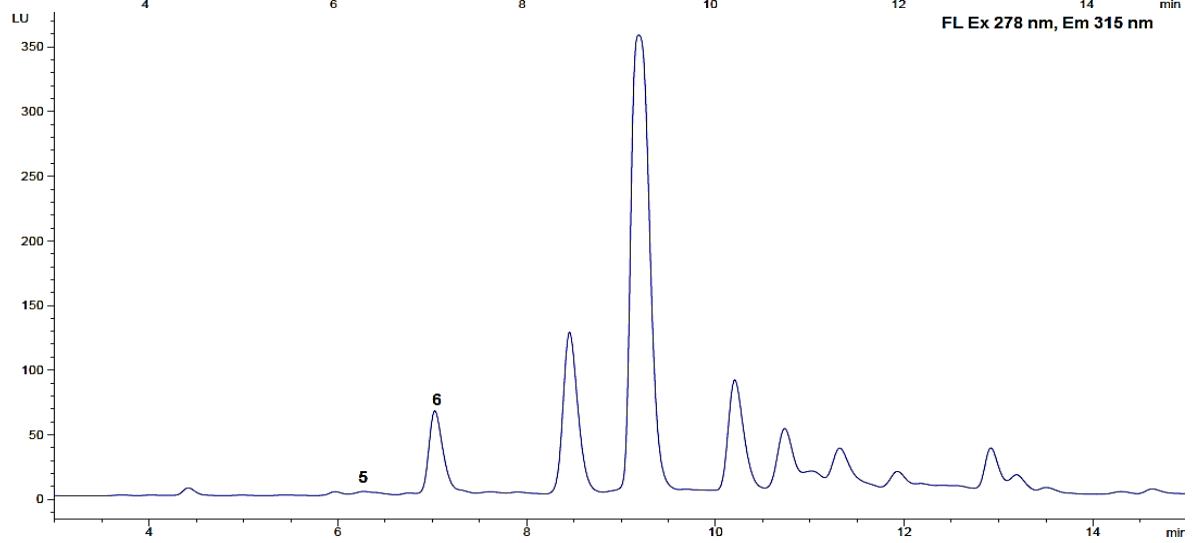
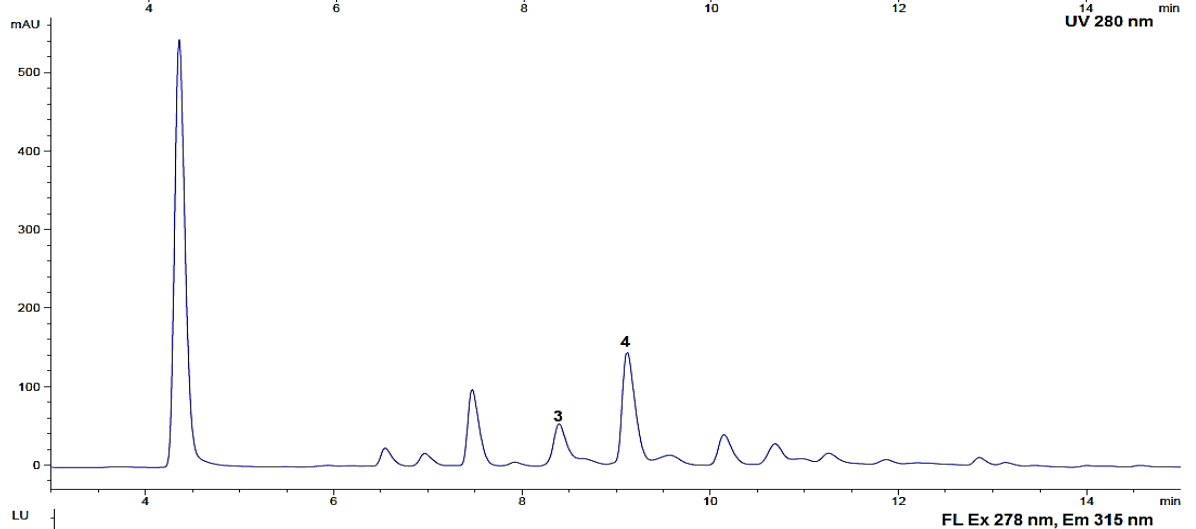
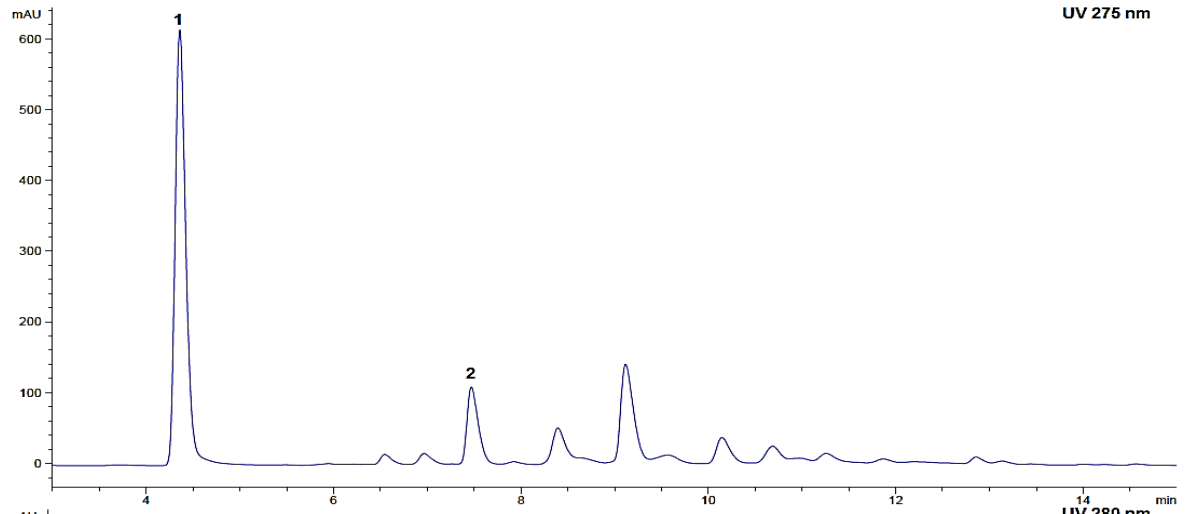
# FEC 2.



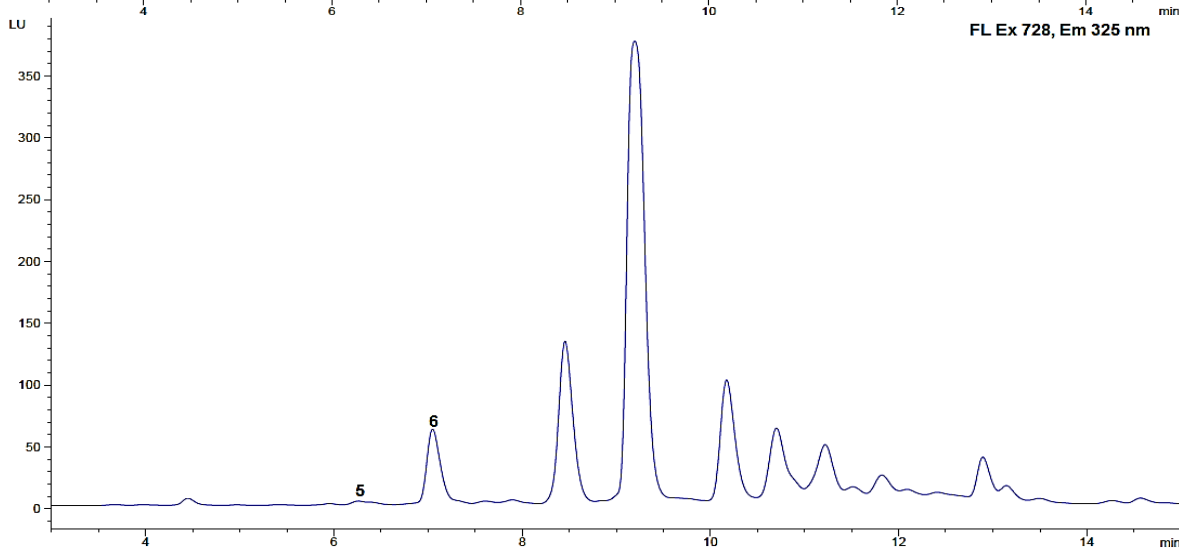
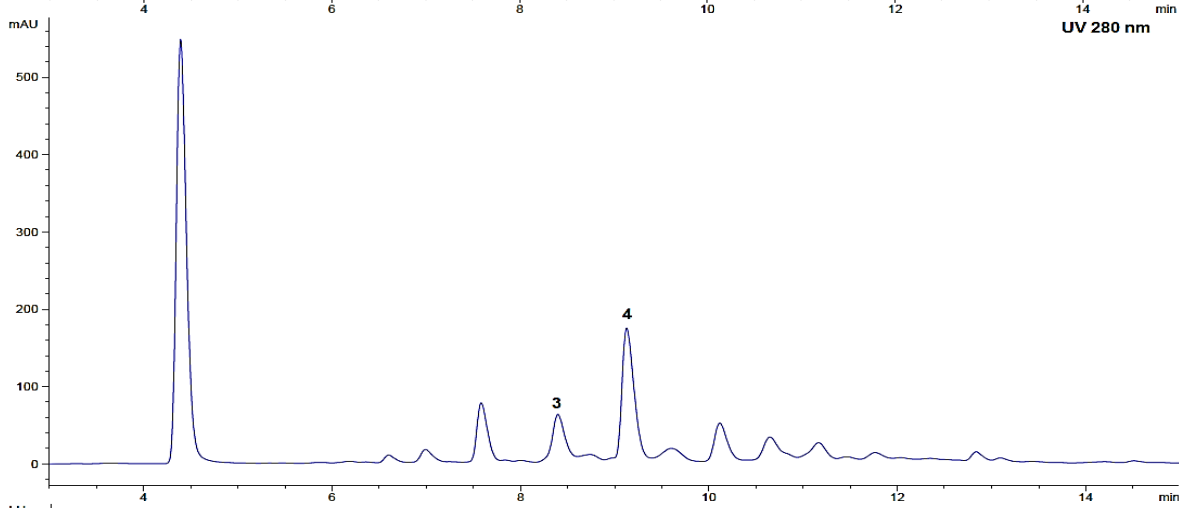
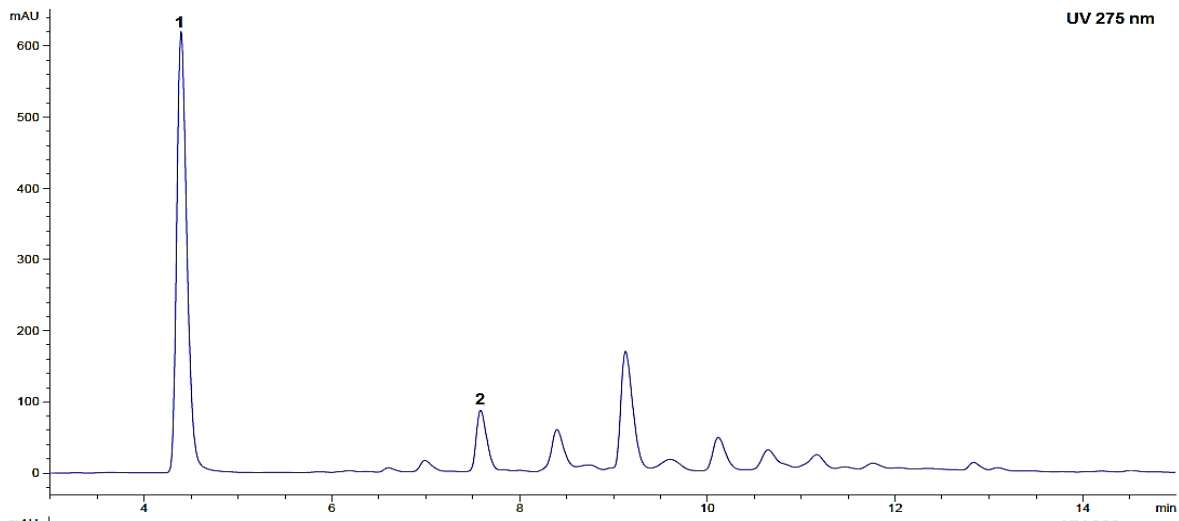
# FLE 2



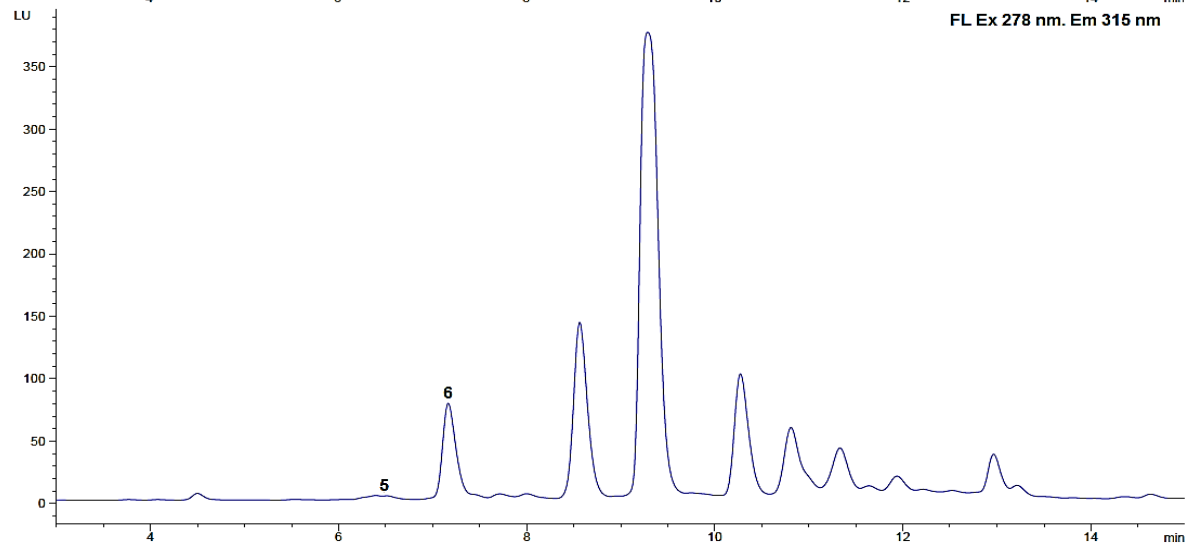
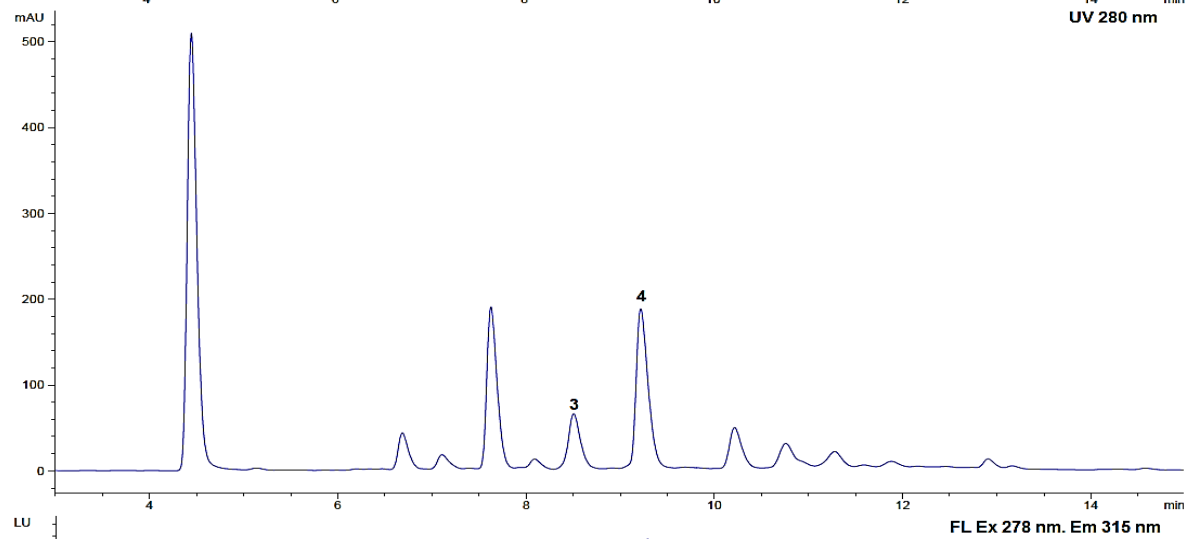
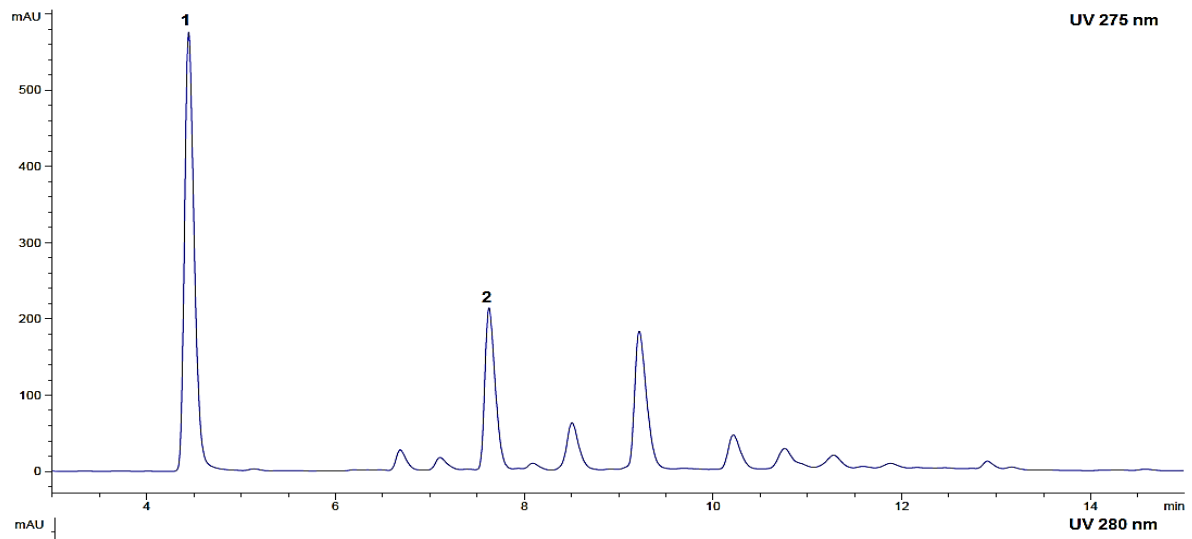
# FLE 3



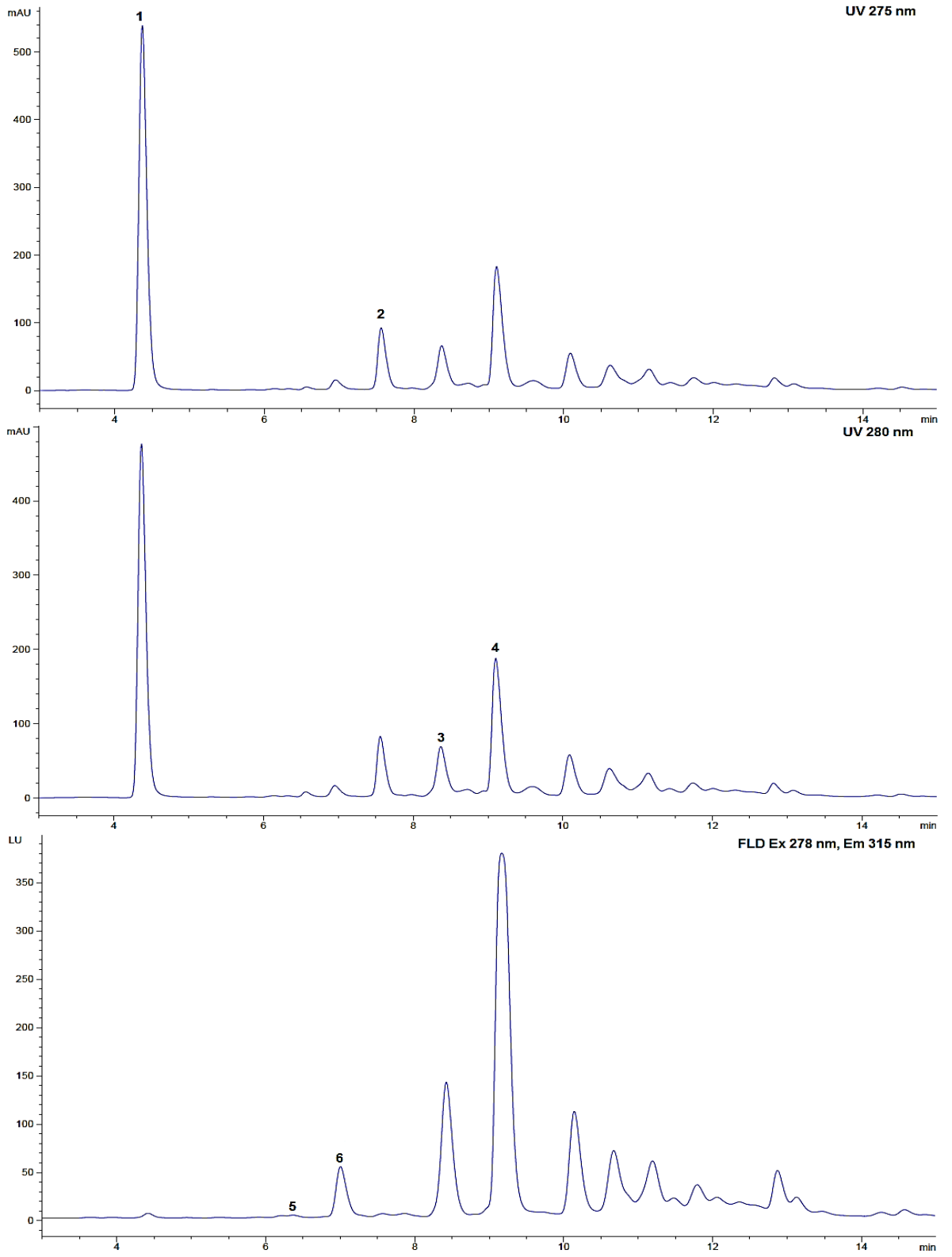
# FSA 13



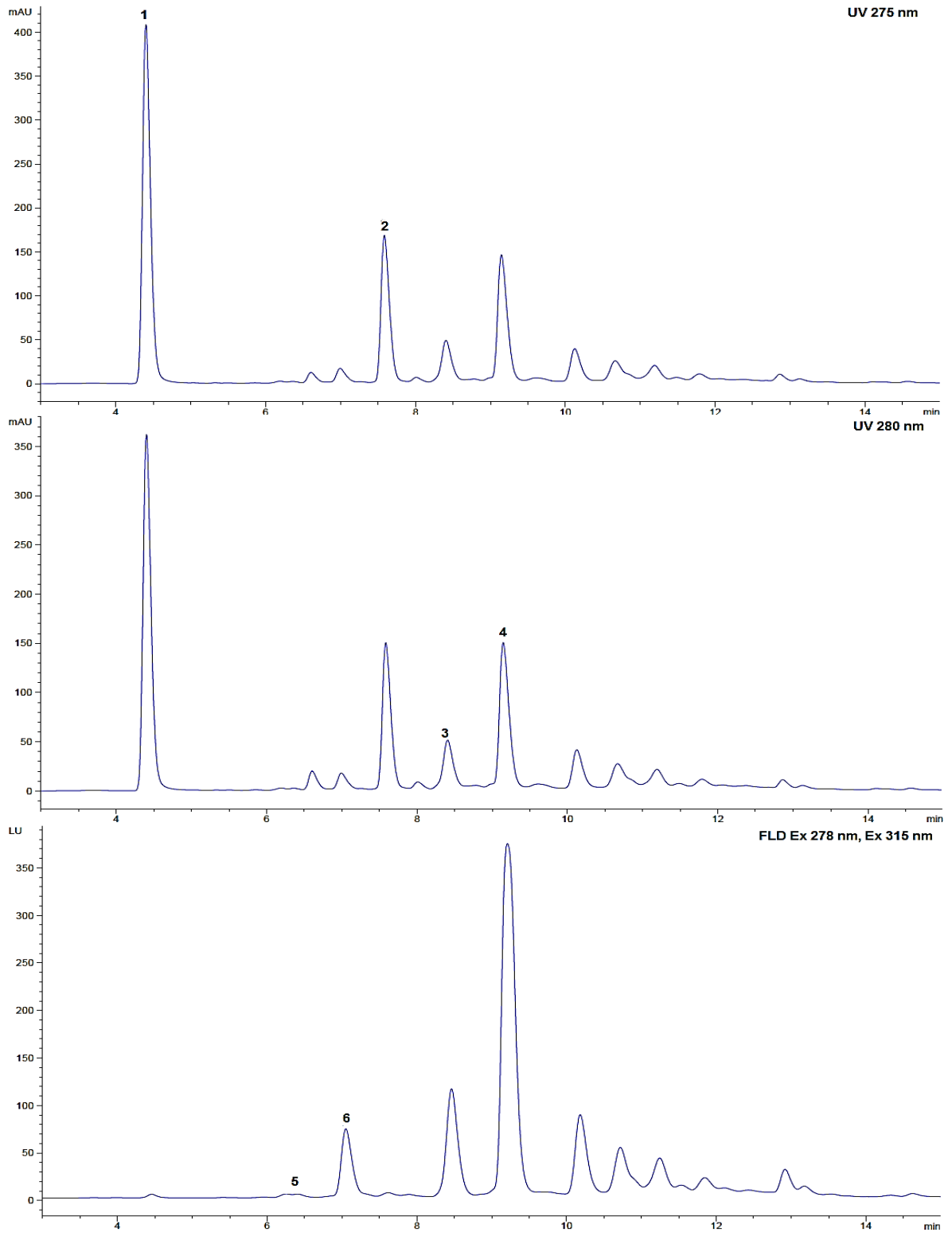
# FSV 155



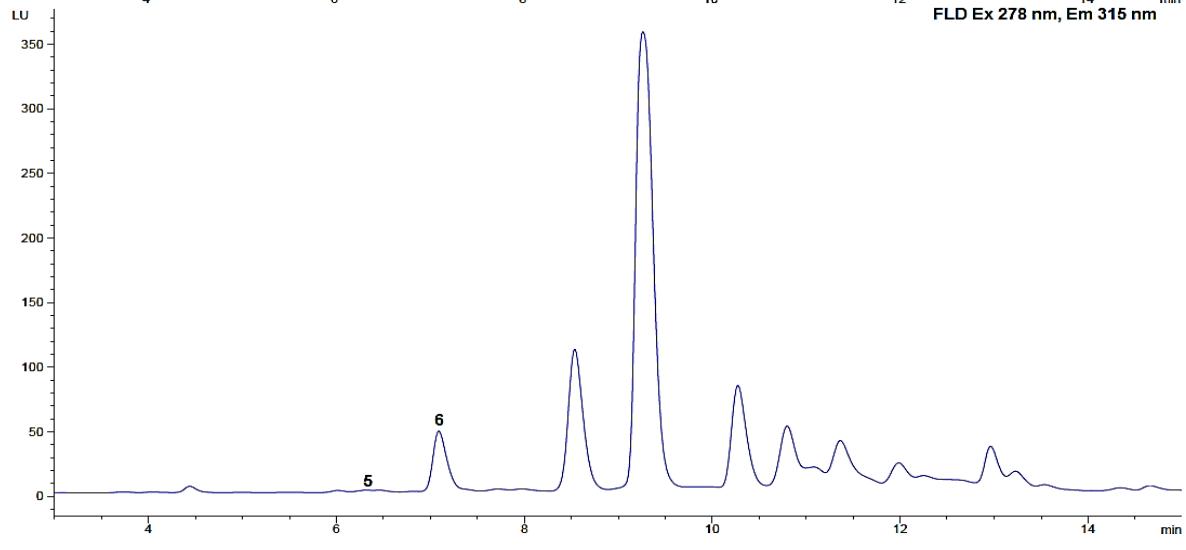
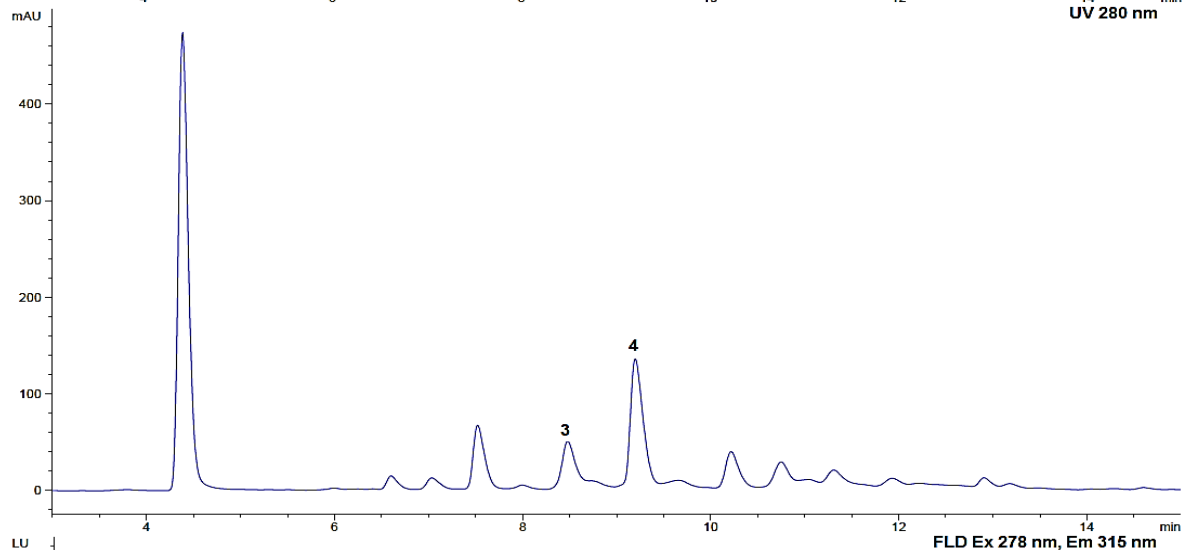
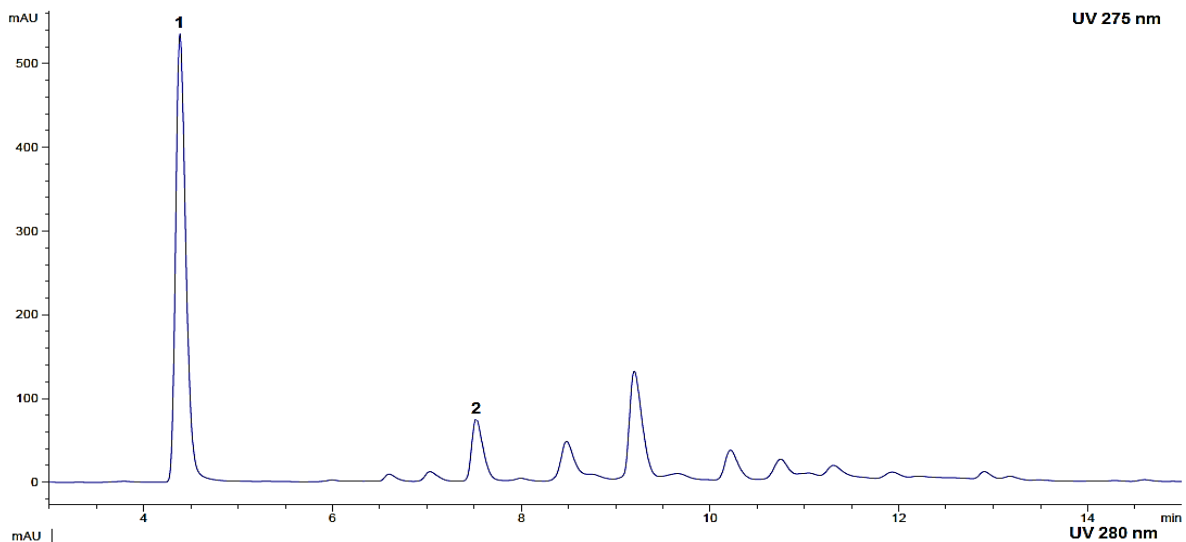
# FSV 25



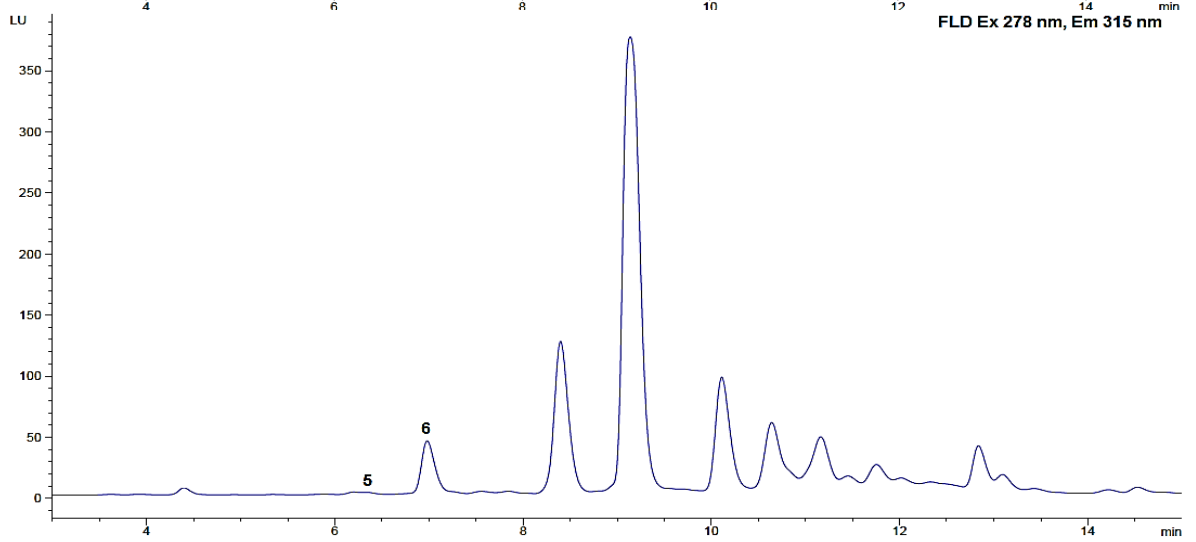
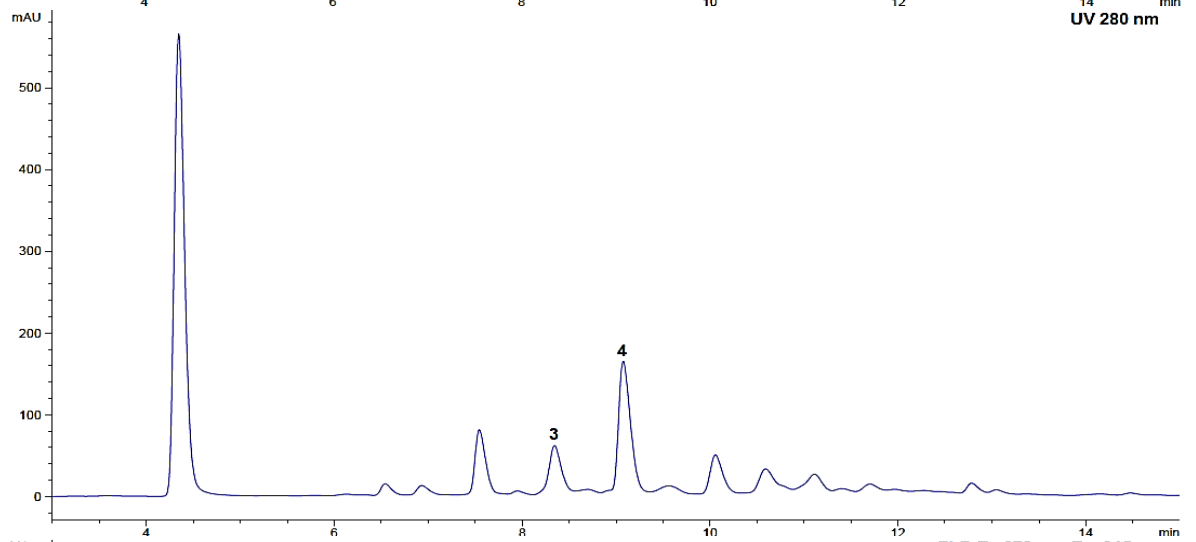
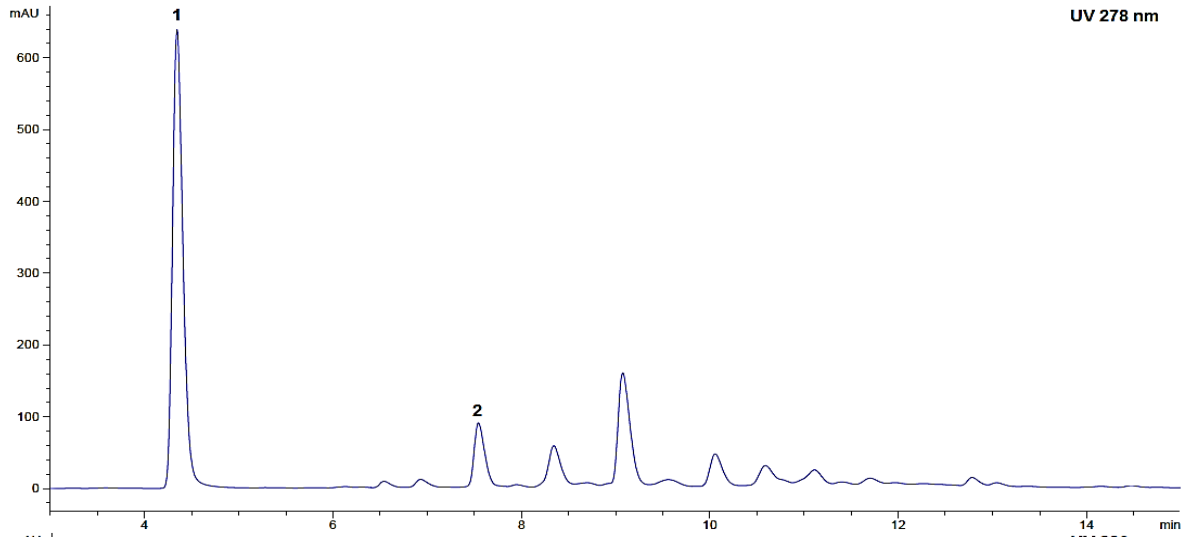
# FSV 41



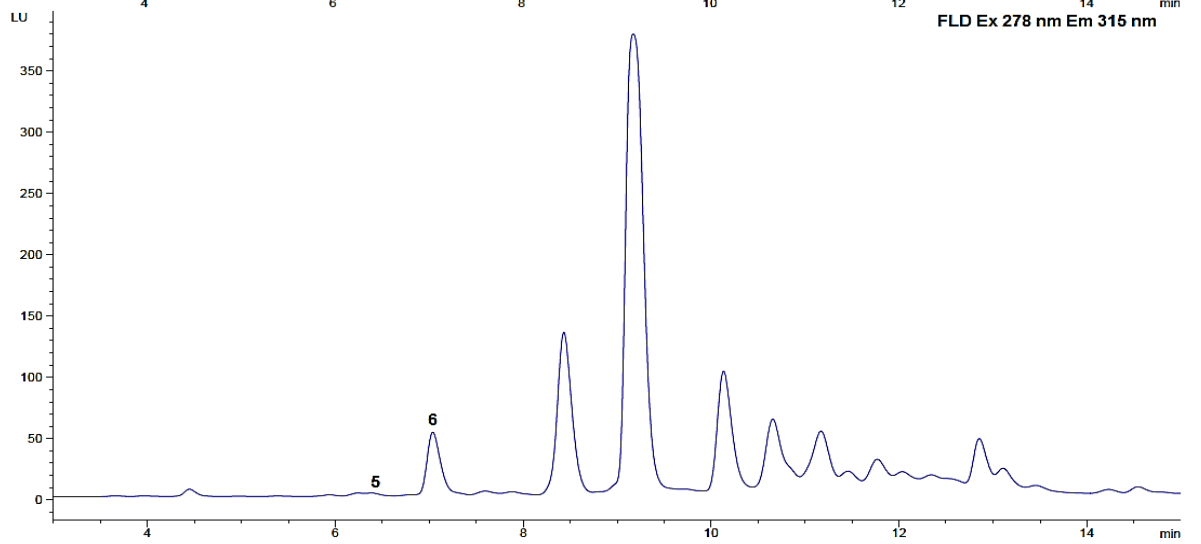
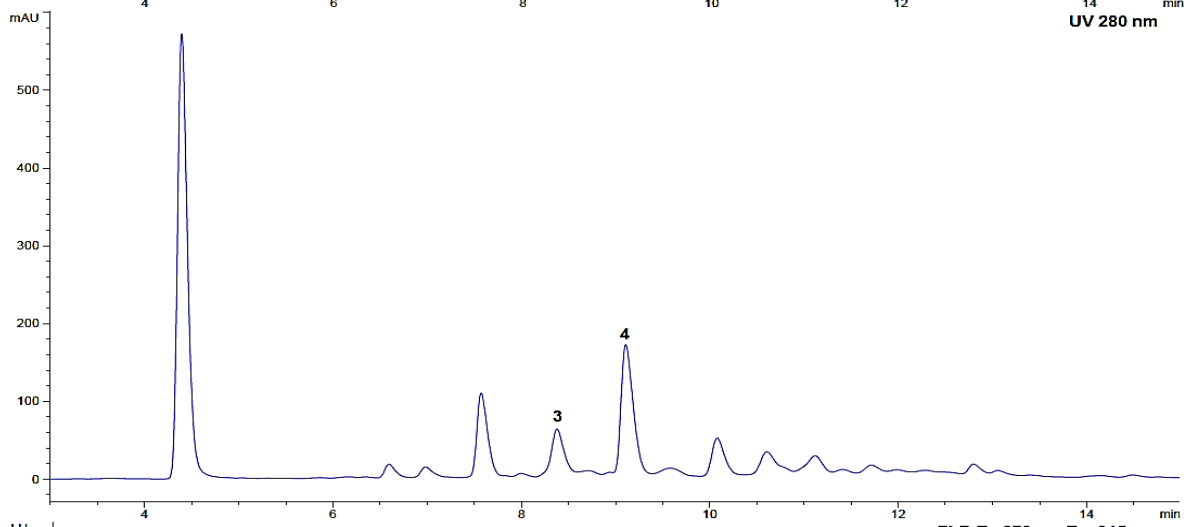
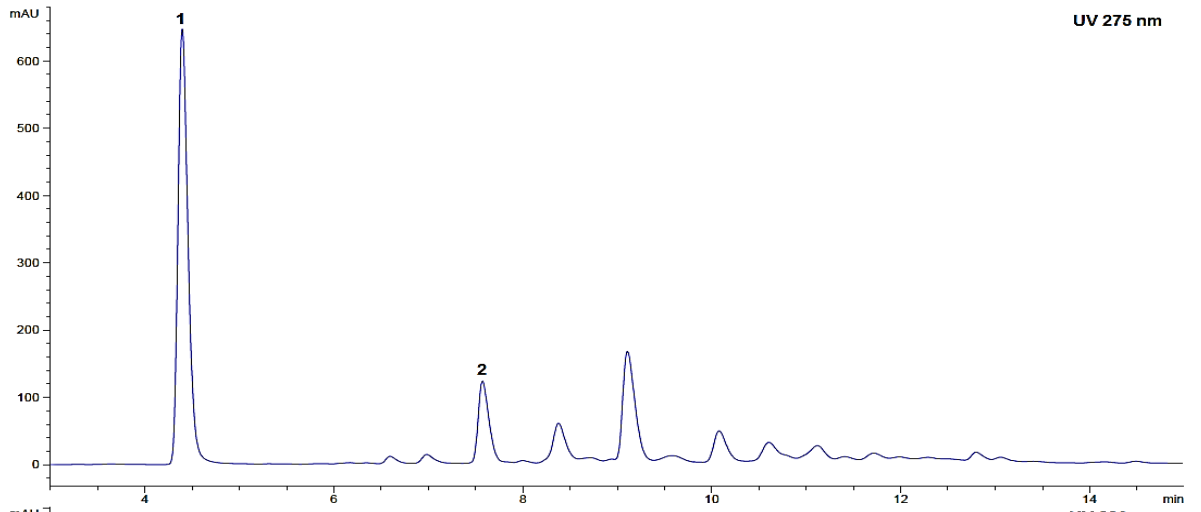
# FTA 2



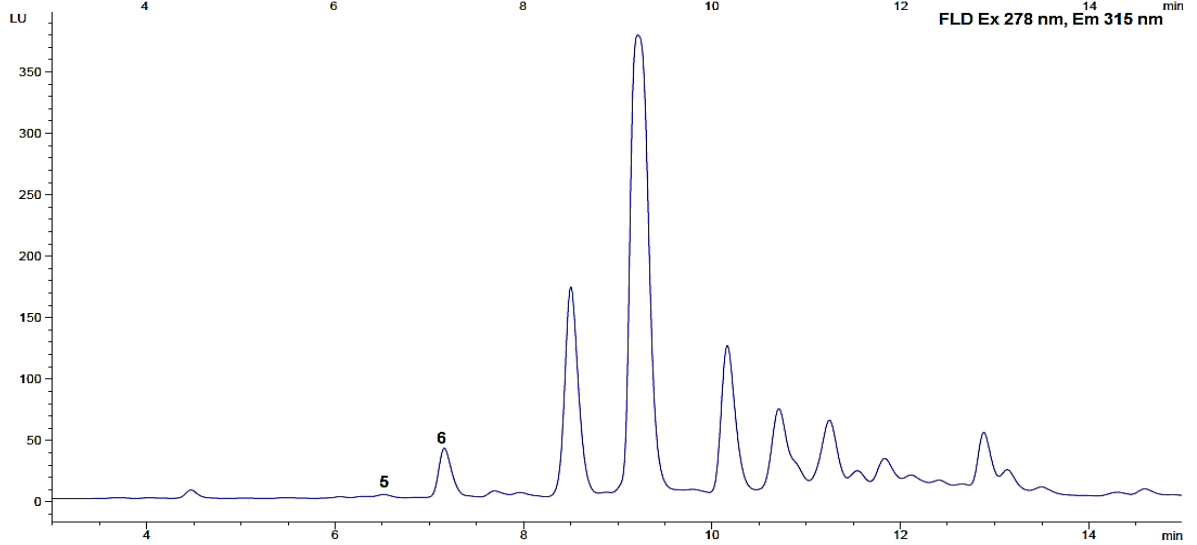
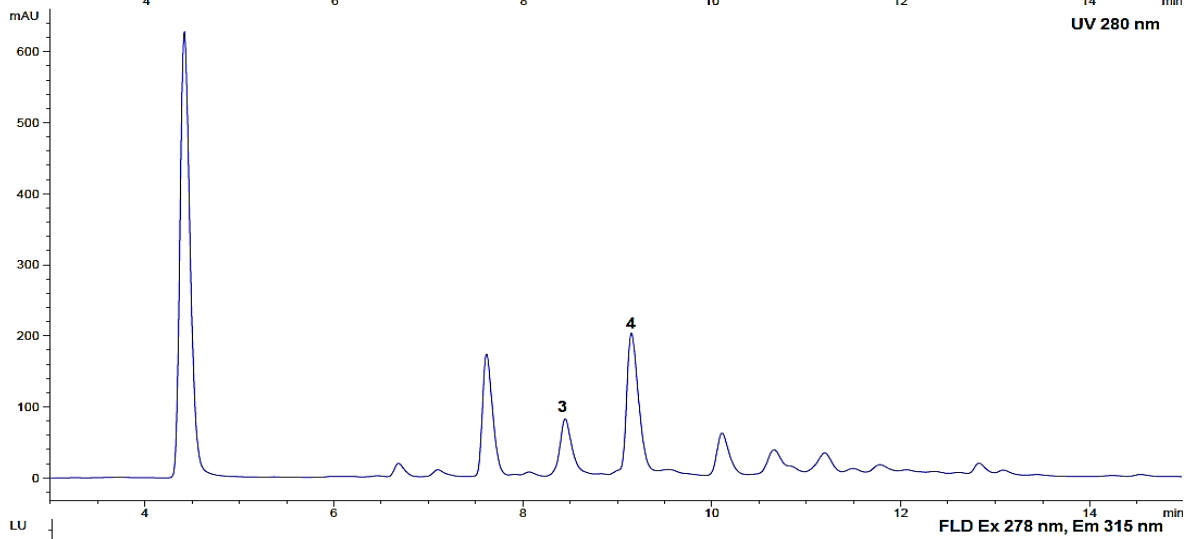
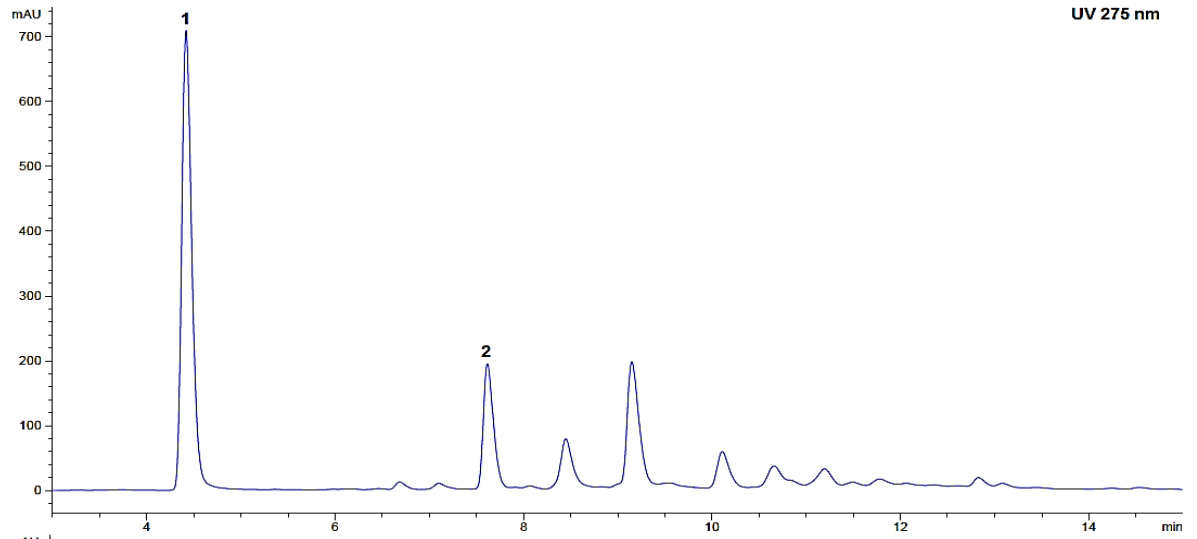
# SCC 61



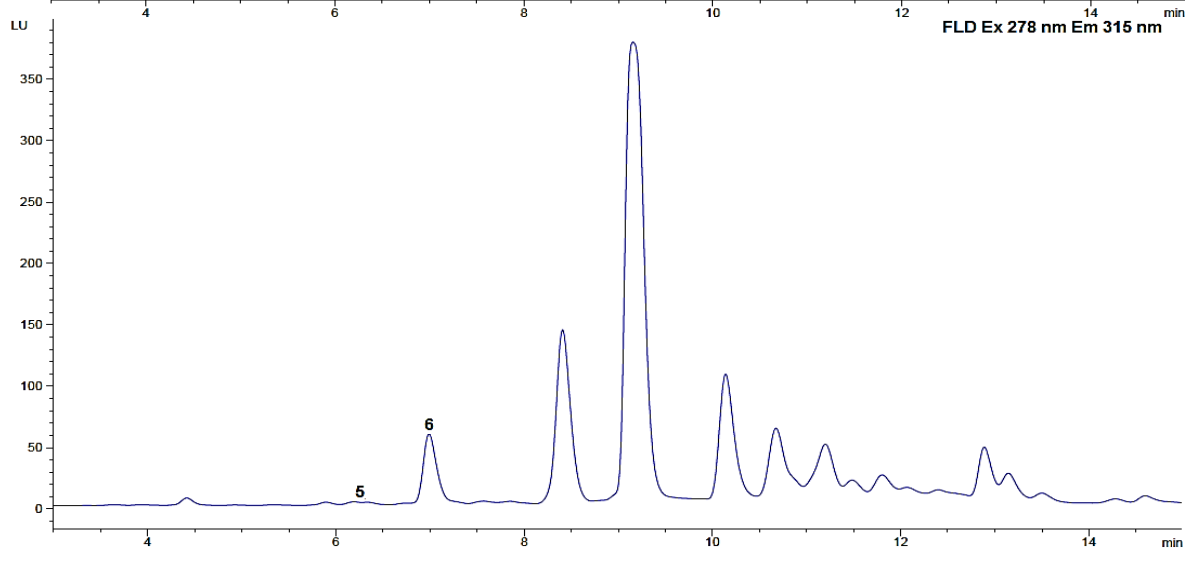
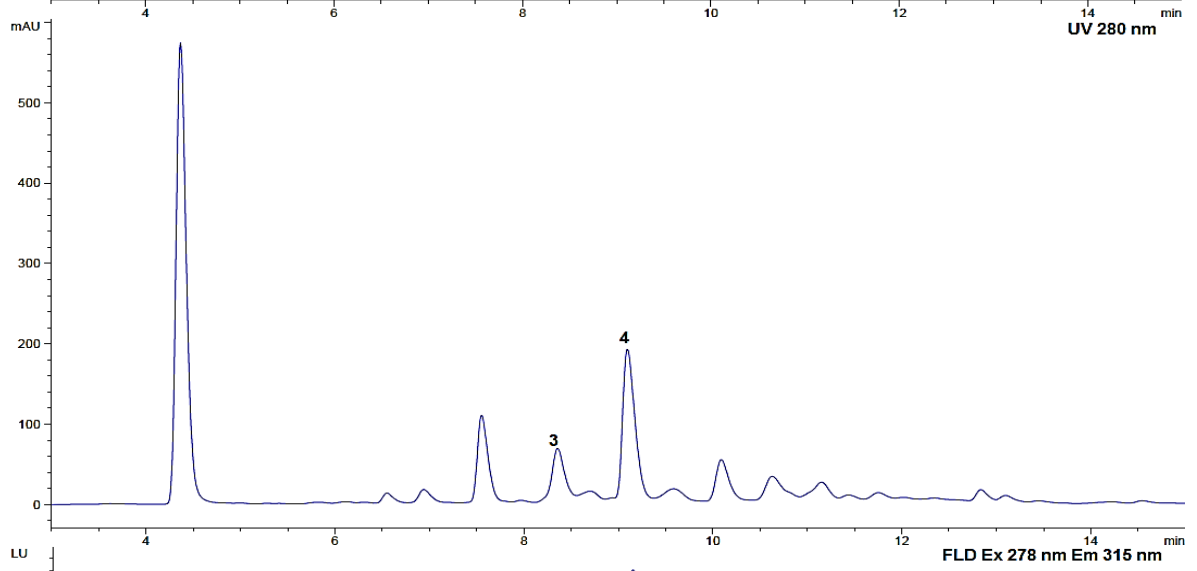
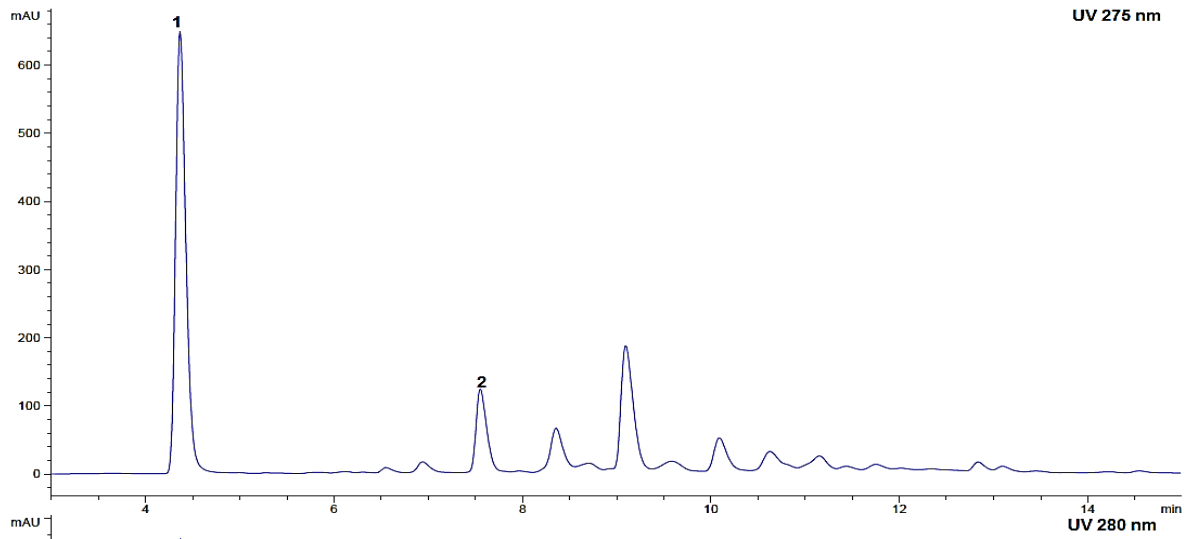
# CCN 51



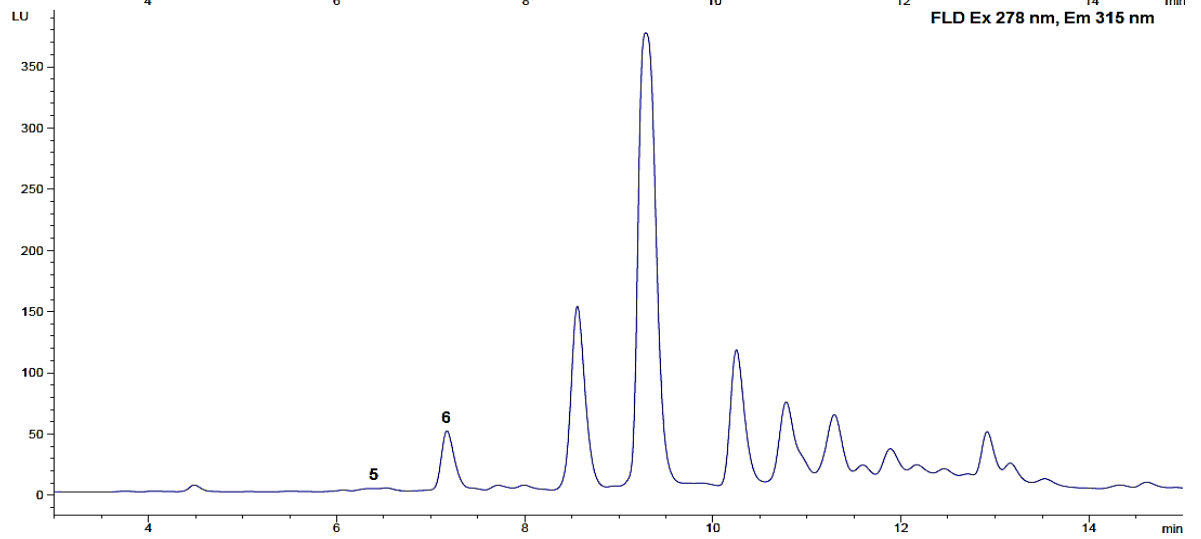
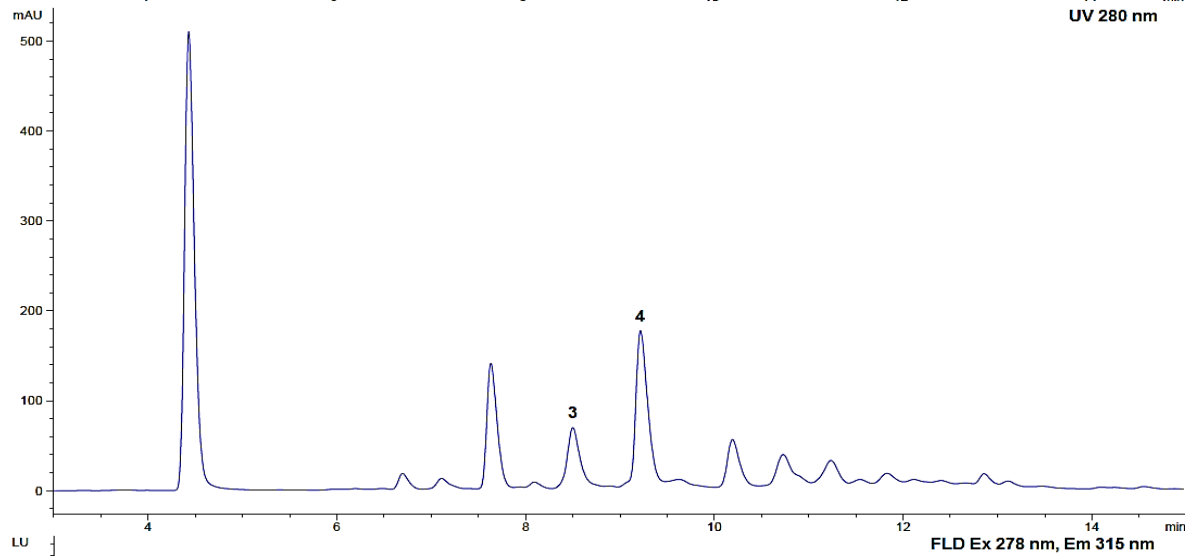
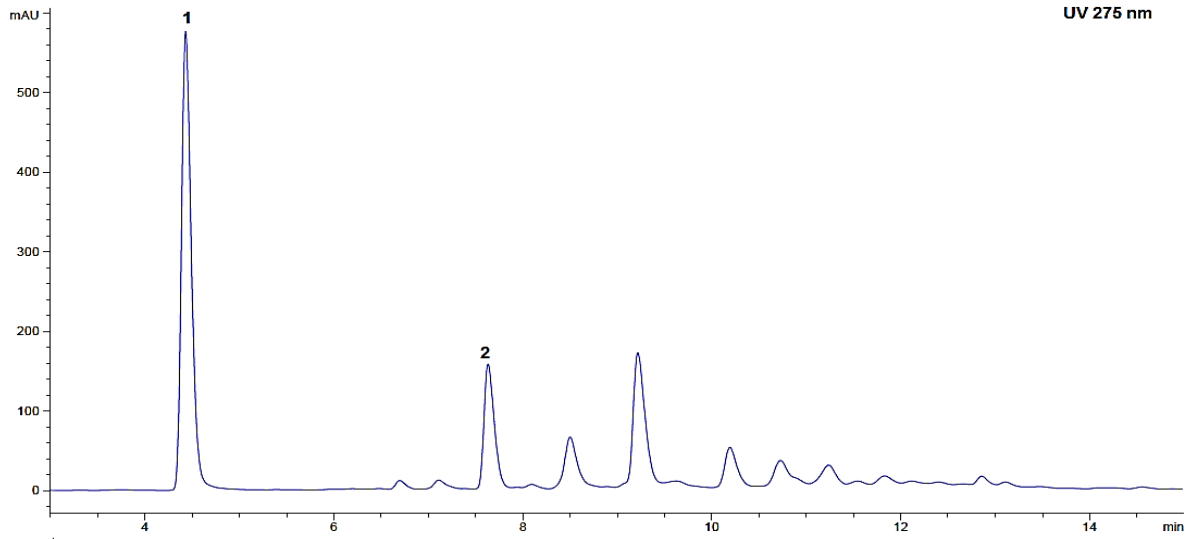
# EET 8



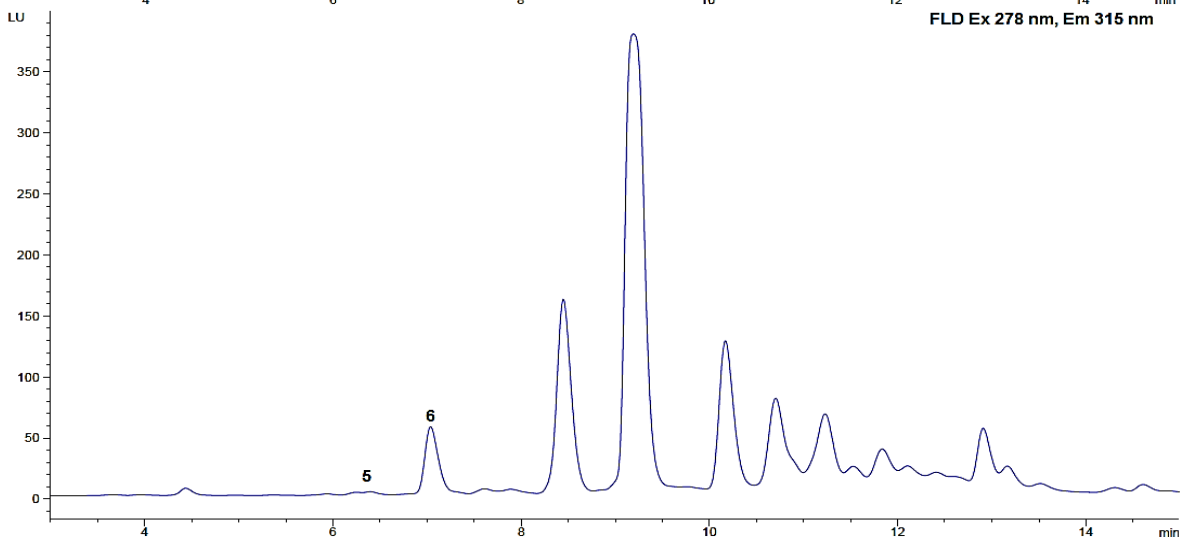
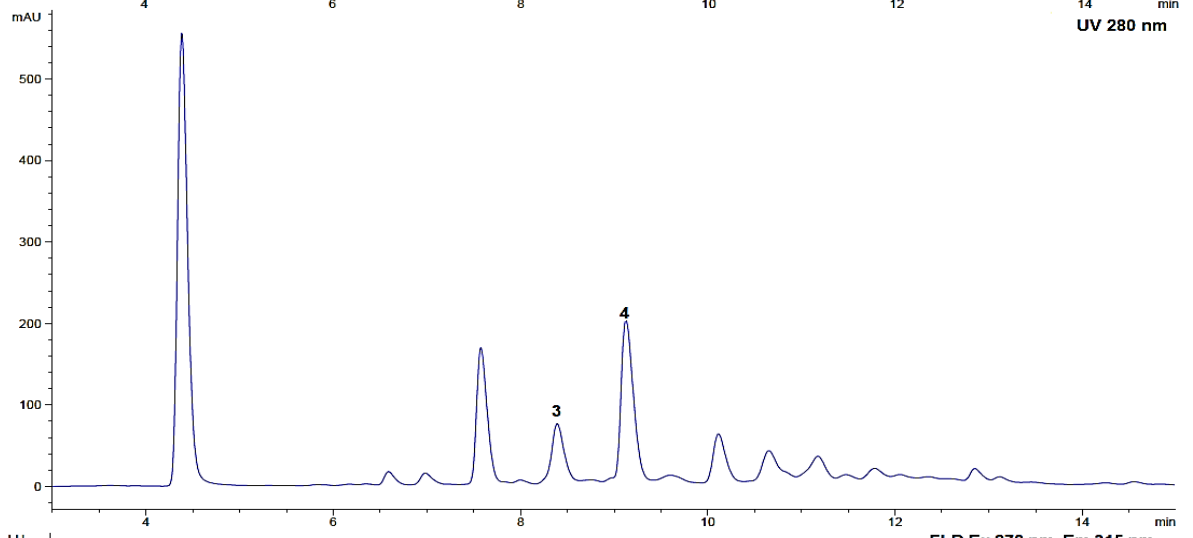
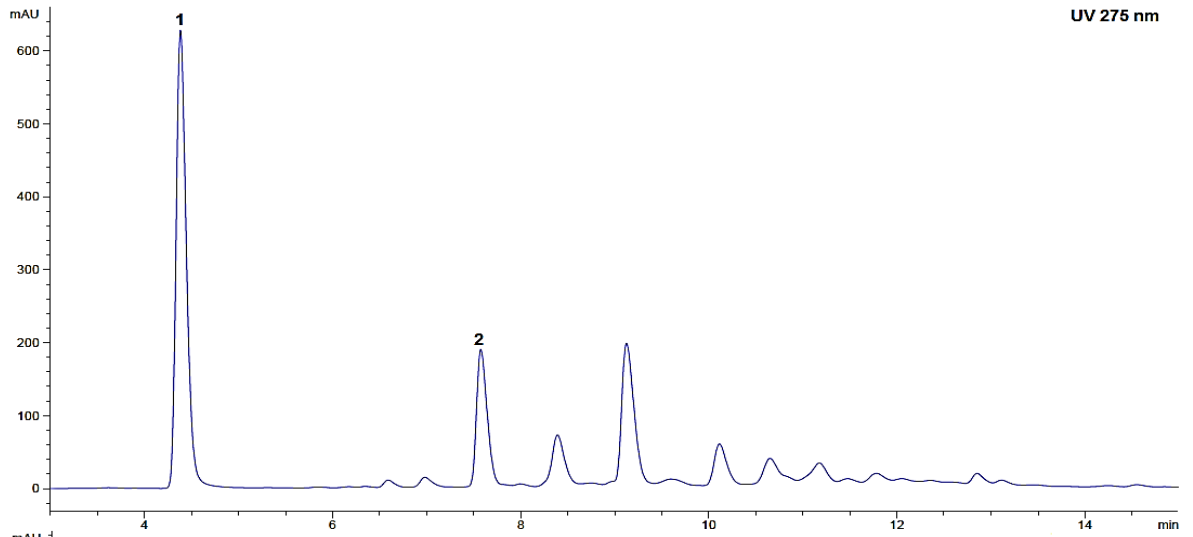
# EET 96



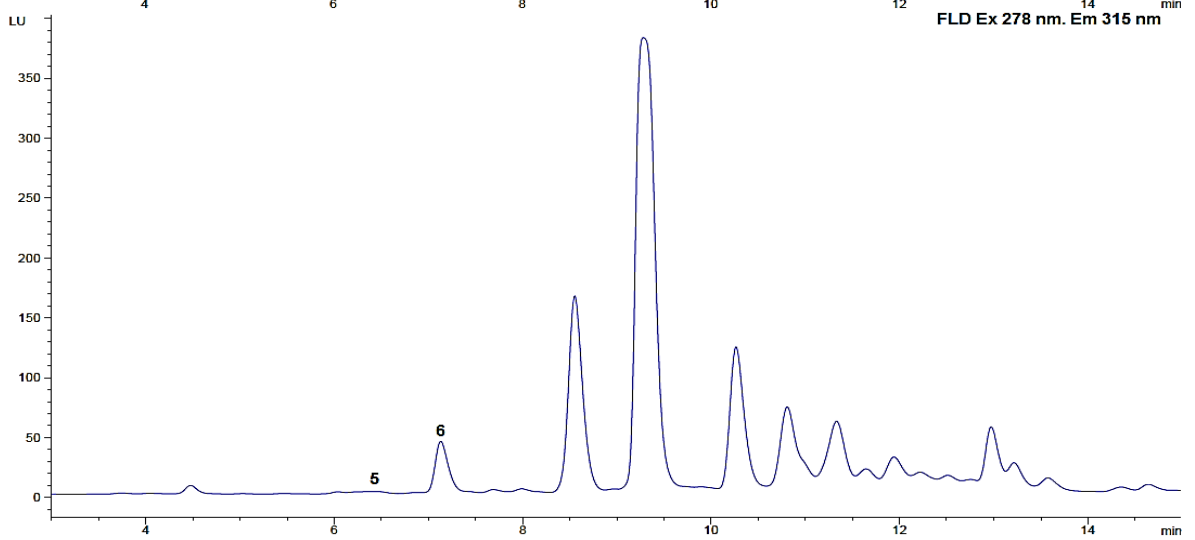
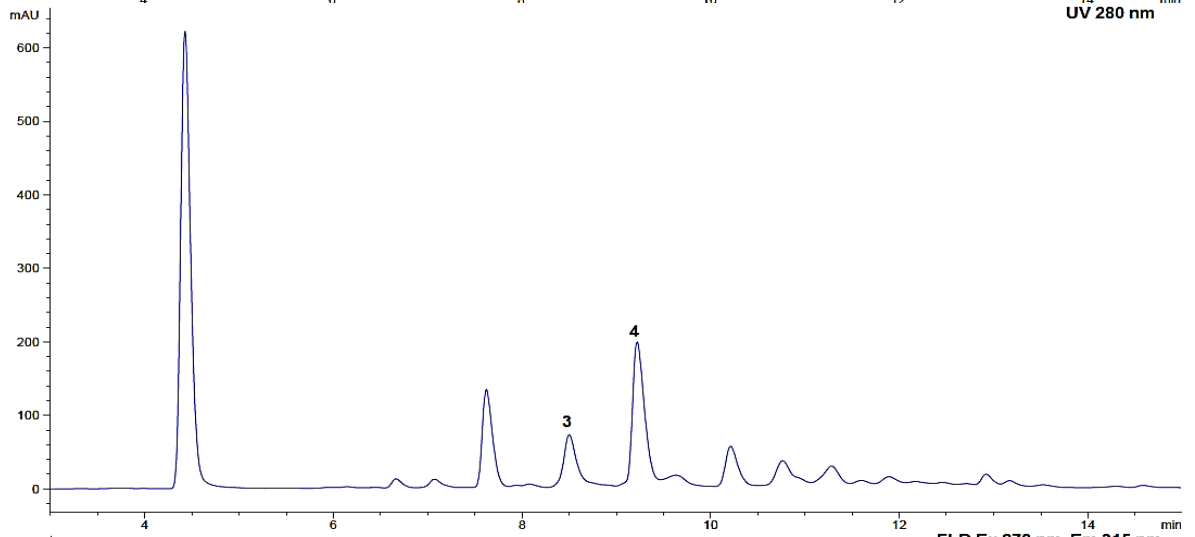
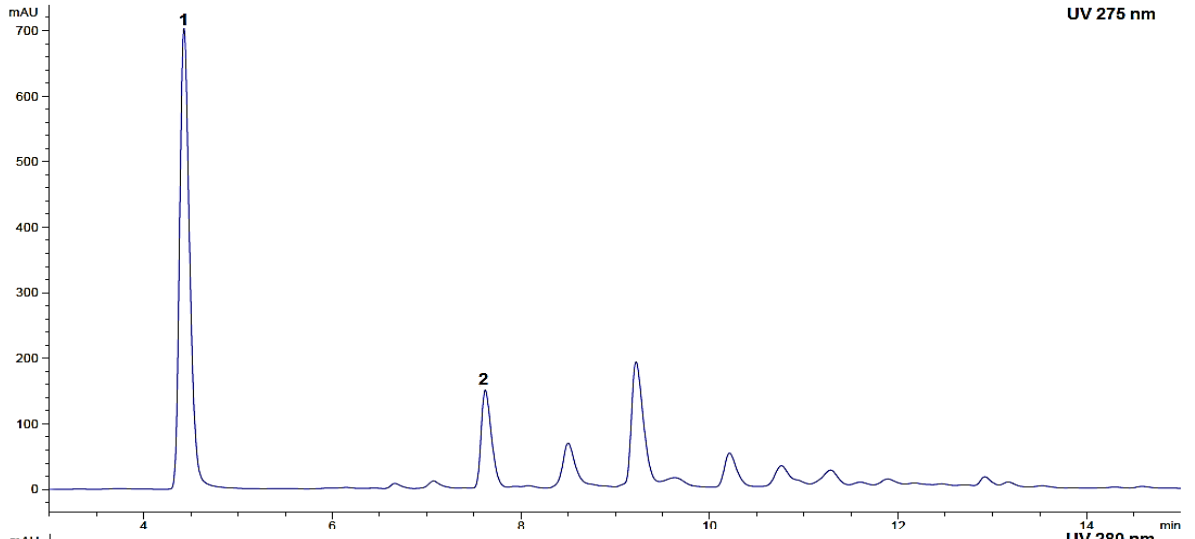
# ICS 1



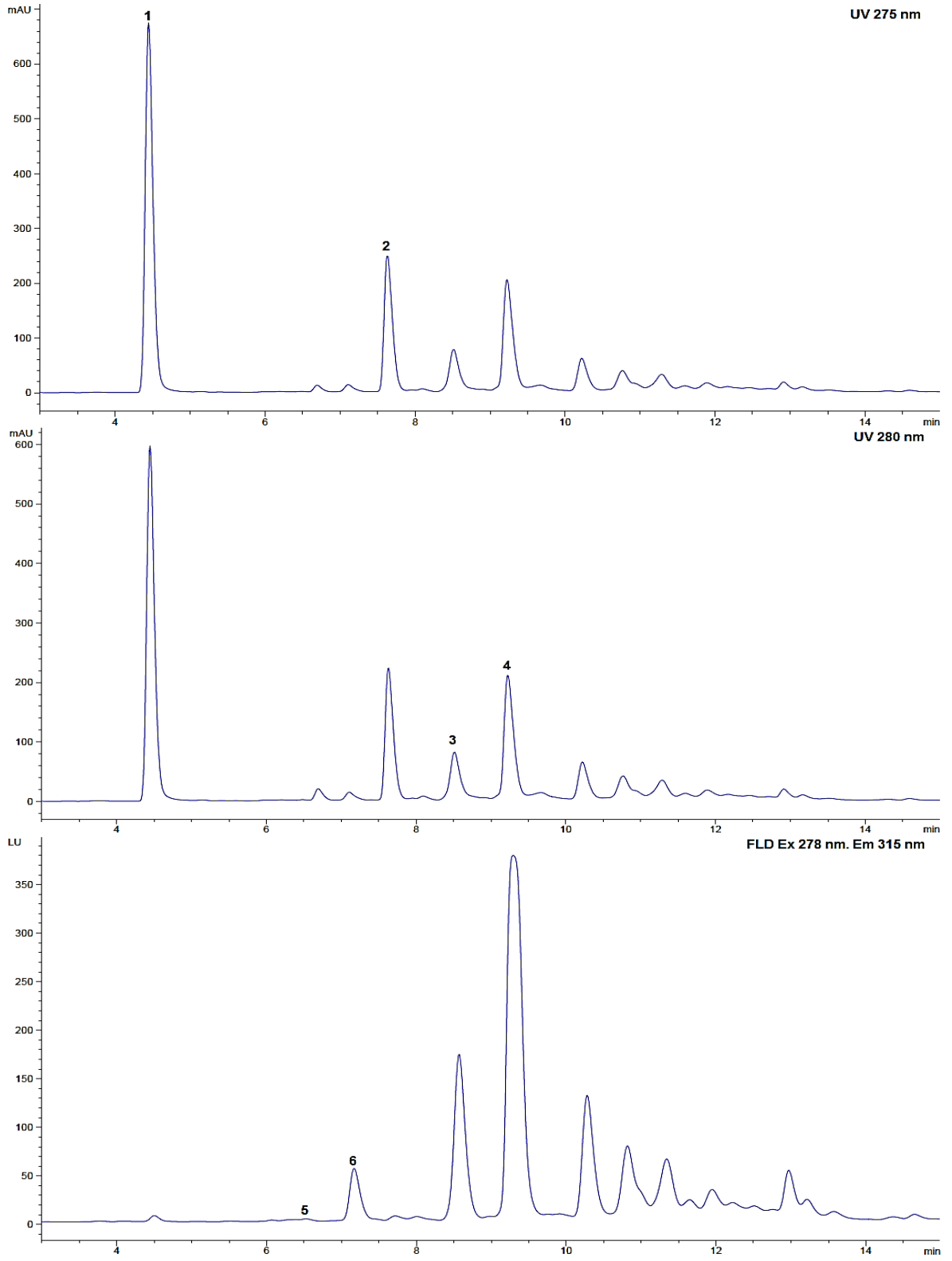
# ICS 39



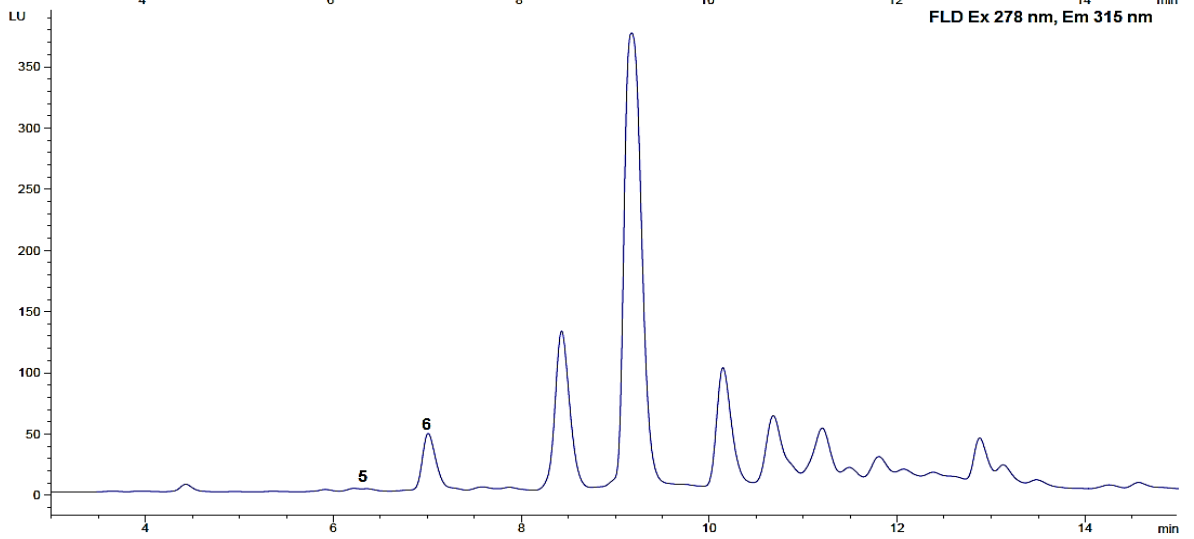
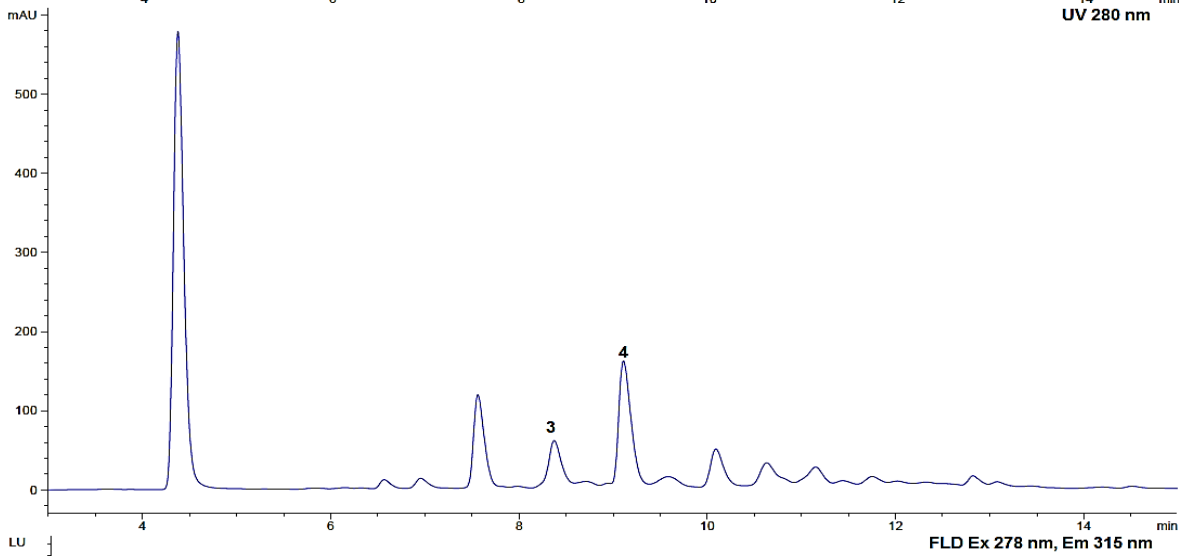
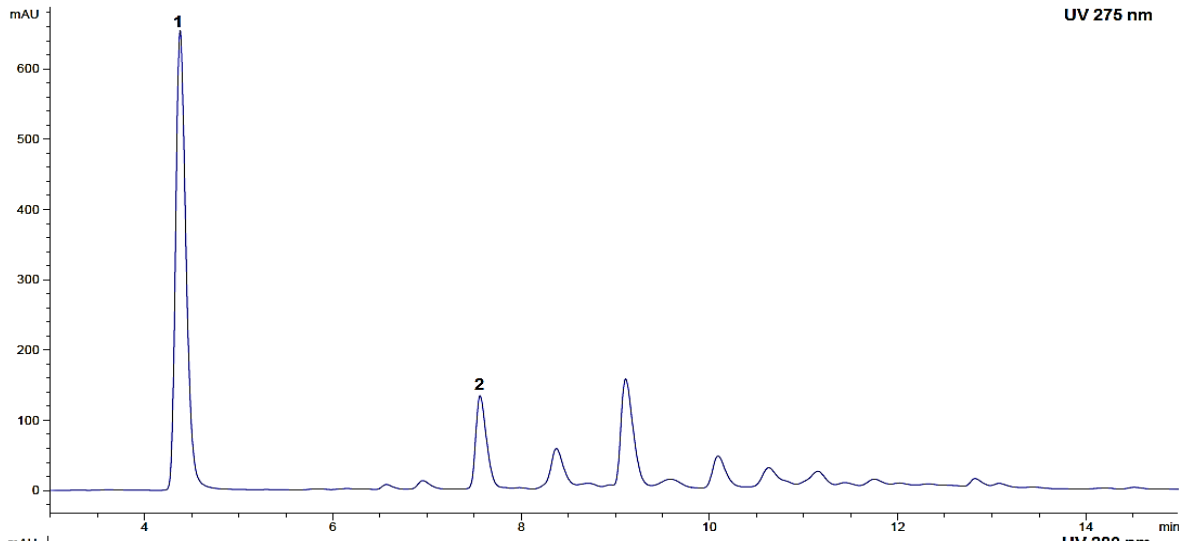
# ICS 6



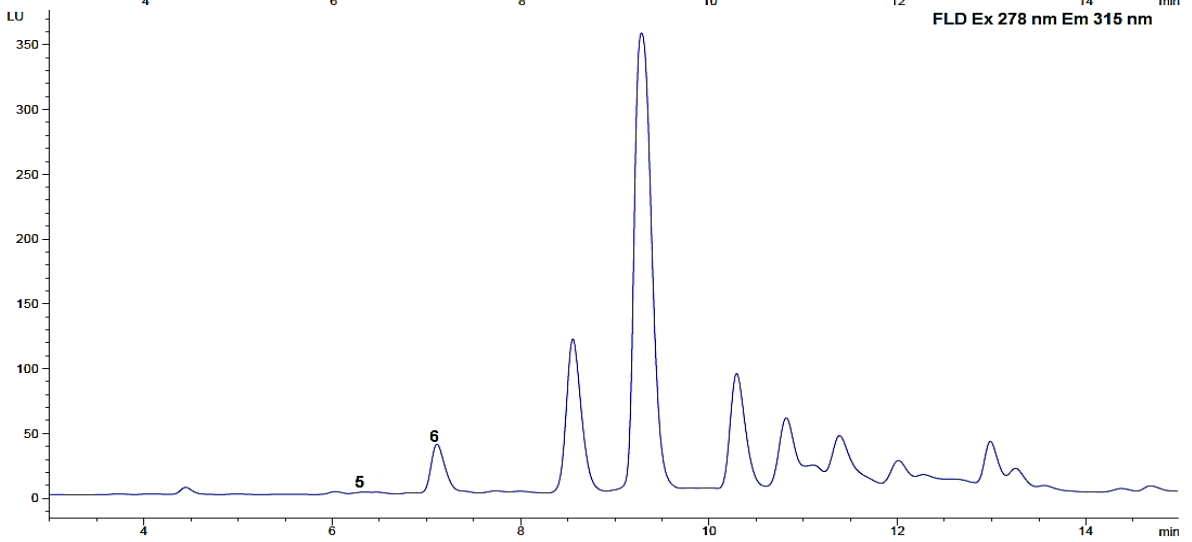
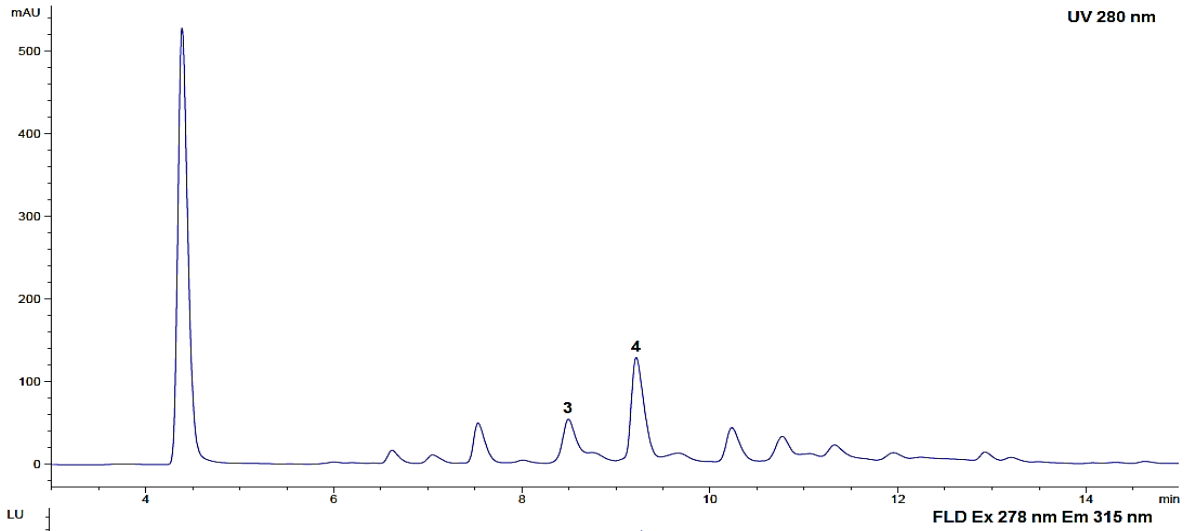
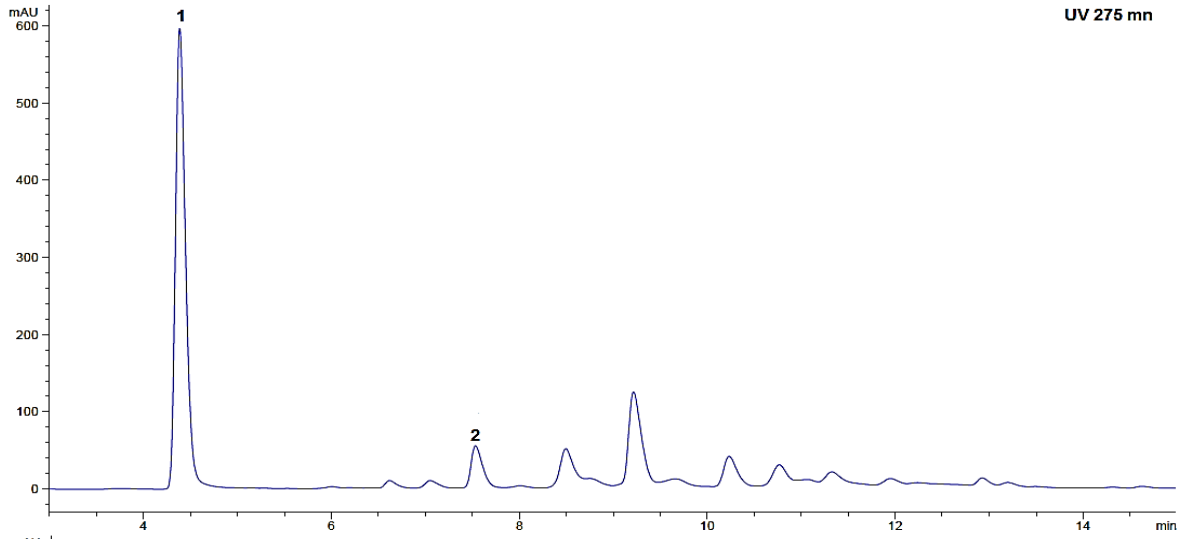
# ICS 60



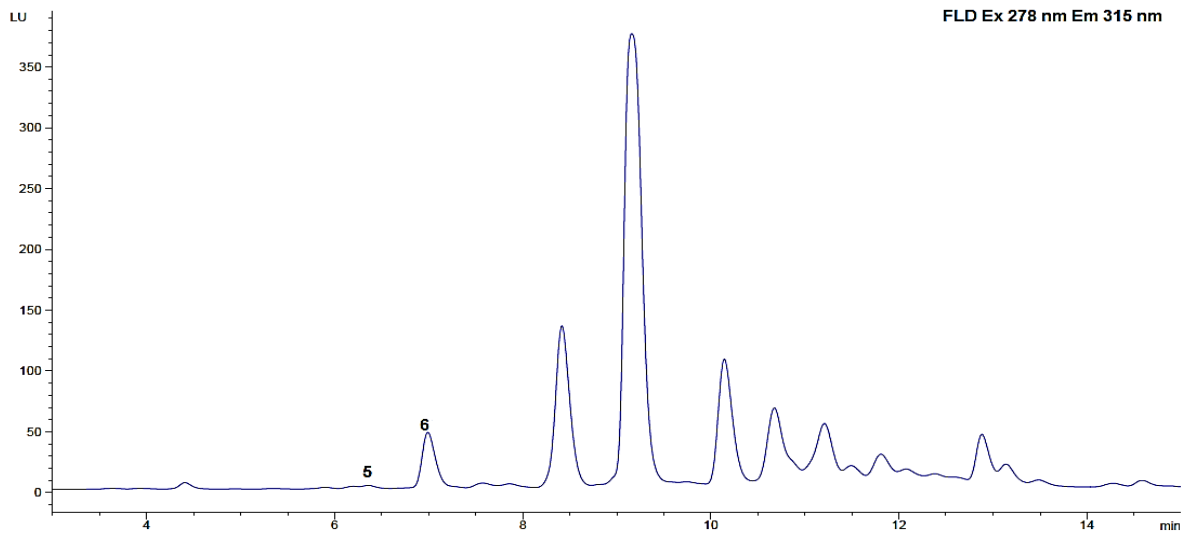
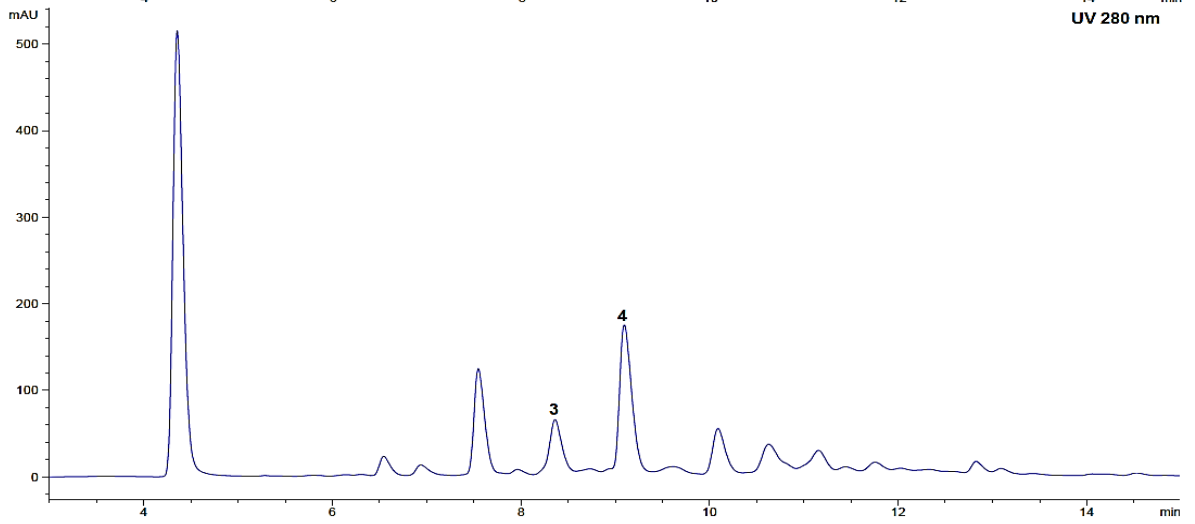
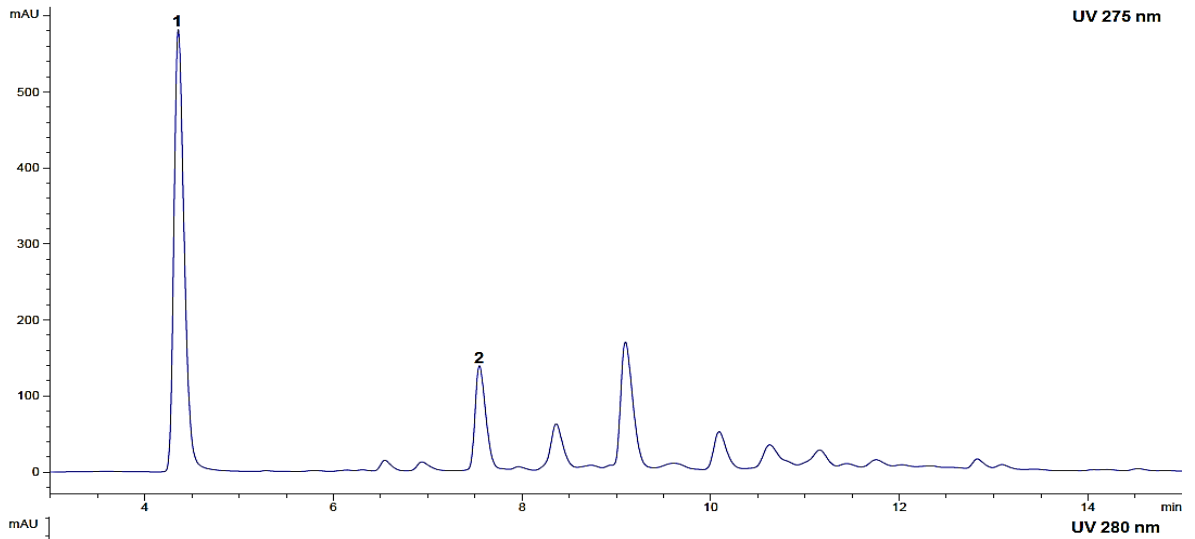
# ICS 95



# IMC 67



# TSH 565



**ANEXO E.** Gráficas de correlación lineal de Pearson para los dúos de variables más significativos.

