

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESAMIENTO DEL CACAO SOBRE EL  
CONTENIDO DE POLIFENOLES Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

**TATIANA CADENA CALA  
YENNY MAYERLY HERRERA ARDILA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2008**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESAMIENTO DEL CACAO SOBRE EL  
CONTENIDO DE POLIFENOLES Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

**TATIANA CADENA CALA  
YENNY MAYERLY HERRERA ARDILA**

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

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2008**

## DEDICATORIA

*“A mis padres Nestor y Rosa, mis tías Bertilda y Josefina por su amor, apoyo y confianza, a mi hermanita Paola por su compañía y a mi novio Checho por su amor incondicional”*

**Yenny Mayerly Herrera Ardila**

*“A mis padres Omar y Janneth a quienes debo todo en la vida, a mis hermanos Vlaldi y Nanda que los adoro y al amor de mi vida Juancho”*

**Tatiana Cadena Cala**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, CICTA, por abrirnos sus puertas y brindarnos los recursos necesarios para la ejecución de este proyecto

A la Dra. Aidé Perea por sus consejos, ayuda y tiempo dedicado para el desarrollo de este trabajo

A la empresa Gironés S.A. por el aporte de las muestras para la realización de este proyecto

A los calificadores por el tiempo dedicado para la evaluación de este proyecto

A toda mi familia por su confianza y su amor

A mis amigos, los que aún están a mi lado para compartir este triunfo, por su incomparable cariño, comprensión y sus mejores deseos

A todos mis amigos del CICTA por su amistad, consejos y sonrisas compartidas

A mi príncipe por haber sido mi gran apoyo durante la realización de este proyecto, por su amor inmenso e incondicional y por hacerme sentir la mujer más feliz del mundo

A la Universidad Industrial de Santander por todo el conocimiento que me permitió adquirir, por las buenas personas que conocí y por los mejores momentos vividos en su recinto

***Yenny Mayerly Herrera Ardila***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, que siempre ha llenado mi vida de bendiciones,

A la Empresa Gironés S.A que nos abrió sus puertas, nos brindo las muestras y nos permitió conocer sus procesos.

Al CICTA, por brindarnos los recursos físicos y económicos necesarios para la realización de este proyecto.

A la Doctora Aidé Perea, que nos brindo la oportunidad de desarrollar este proyecto y que me enseñó cosas muy valiosas para mi formación como profesional y como persona.

A mis Padres y hermanos que con sus palabras de apoyo y amor incondicional me ayudaron a superar todos los momentos difíciles y a creer en mis capacidades.

A mi Amorcito por estar siempre a mi lado, por comprenderme, escucharme, aconsejarme y trabajar junto a mí para sacar adelante este trabajo. TE AMO

A mi colega y amiga Naty con quien he compartido tantos momentos gratos de mi vida desde el colegio hasta la culminación de nuestra carrera, a Carlos Mario, Karen, Roa, Nazly, La Nogy, Naty Conde y demás compañeros de la carrera con los cuales estude y compartí bellos momentos durante estos 6 años en la Universidad.

A mis compañeros del CICTA, Luisk, Yenny, Gloria, Erick, Sandra, Daniel, Jennifer, Olguita y Arley por todo su apoyo y por hacer divertidos los momentos de trabajo.

***Tatiana Cadena Cala***

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	3
1.1 ANTIOXIDANTES	3
1.2 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS	4
1.3 CACAO	7
1.4 PROCESO DE MANUFACTURA DEL CHOCOLATE	9
1.5 PRODUCTOS DE CHOCOLATE	11
1.6 POLIFENOLES EN EL CACAO Y SUS PRODUCTOS	11
1.7 MEDICIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	15
1.7.1 Barrido (Scavenging) del Radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	16
1.7.2 Ensayo de potencial antioxidante de reducción del hierro FRAP	17
1.7.3 Ensayo espectrofotométrico de antioxidantes totales sobre ABTS <sup>+</sup>	18
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	20
2.1 MATERIALES Y REACTIVOS	
2.1.1 Reactivos	20
2.1.2 Equipos y material de laboratorio	20
2.1.3 Muestras	20
2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DESENGRASADO	23

<b>2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS</b>	<b>25</b>
<b>2.3.1 Determinación del contenido de humedad y grasa de las muestras</b>	<b>25</b>
<b>2.3.2 Preparación de extractos</b>	<b>25</b>
<b>2.3.3 Ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C)</b>	<b>25</b>
<b>2.3.4 Medición de la Actividad antioxidante</b>	<b>26</b>
<b>2.3.5 Extracción y Cuantificación de (-)-Epicatequina y (±)-Catequina por HPLC</b>	<b>27</b>
<b>2.3.6 Análisis estadístico</b>	<b>28</b>
<b>3. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	<b>29</b>
<b>3.2 EVALUACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES</b>	<b>32</b>
<b>3.3 EVALUACIÓN DE (-)-EPICATEQUINA Y (±)-CATEQUINA</b>	<b>36</b>
<b>3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b>	<b>39</b>
<b>3.4.1 Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2 Ensayo de potencial de reducción del hierro FRAP</b>	<b>43</b>
<b>3.4.3 Antioxidantes totales sobre le radical ABTS<sup>+</sup></b>	<b>46</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>5. RECOMENDACIONES</b>	<b>54</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>66</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Principales compuestos polifenólicos	6
<b>Tabla 2.</b> Contenido polifenólico en semillas de cacao	12
<b>Tabla 3.</b> Cantidades de muestras recolectadas en la fábrica	21
<b>Tabla 4.</b> Variables independientes y niveles de diseño	24
<b>Tabla 5.</b> Resultados del diseño experimental	30
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de polifenoles (mg AG/g)	31
<b>Tabla 7.</b> Coeficientes de regresión del modelo polinomial	32
<b>Tabla 8.</b> Contenido de humedad, grasa total determinada por el método de Soxhlet y grasa extraída de las muestras por el método de ultrasonido y n hexano	33
<b>Tabla 9.</b> Contenido de (-)-Epicatequina, (±)-Catequina y suma de los dos flavonoides en las muestras	38
<b>Tabla 10.</b> Concentración efectiva media EC <sub>50</sub> de las muestras sobre el radical DPPH	41
<b>Tabla 11.</b> Reducción del hierro expresada como $\mu\text{mol Fe (II)/g}$ para sustancias de referencia	46
<b>Tabla 12.</b> Antioxidantes totales sobre el radical ABTS <sup>+</sup> para sustancias de referencia	48
<b>Tabla 13.</b> Resumen de los polifenoles totales y la actividad antioxidante medida por los métodos DPPH, FRAP y ABTS <sup>+</sup> para todas las muestras	50

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura básica de los flavonoides	5
<b>Figura 2.</b> Estructura del radical DPPH	16
<b>Figura 3.</b> Reacción del ensayo de FRAP	18
<b>Figura 4.</b> Estructura del 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) ABTS <sup>•+</sup>	18
<b>Figura 5.</b> Proceso de manufactura del chocolate de mesa tradicional en la fábrica Gironés S.A. y zonas de muestreo	22
<b>Figura 6.</b> Perfil cromatográfico de un extracto de semilla seca y fermentada	37
<b>Figura 7.</b> Equilibrio térmico de (±)-Catequina y (-)-Epicatequina	38

## LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
<b>Gráfica 1.</b> Diagrama de efectos principales sobre la variable respuesta	29
<b>Gráfica 2.</b> Superficie de respuesta obtenida para el contenido de polifenoles (mg AG/g)	32
<b>Gráfica 3.</b> Variación del contenido de polifenoles totales en el proceso de elaboración de chocolate de mesa	35
<b>Gráfica 4.</b> Contenido de polifenoles totales de los diferentes chocolates de mesa	36
<b>Gráfica 5.</b> Variación de la actividad antioxidante sobre el radical (DPPH) de: <b>(A)</b> En la línea del proceso para la elaboración de chocolate y <b>(B)</b> Productos finales	40
<b>Gráfica 6.</b> Actividad antioxidante de las sustancias de referencia sobre el radical DPPH <b>(A)</b> . Actividad antioxidante sobre el radical DPPH en cuatro tipos de chocolate de mesa <b>(B)</b>	42
<b>Gráfica 7.</b> Relación entre el contenido de polifenoles totales (mg ÁG/g) y la actividad antioxidante ( $EC_{50}$ ) (mg/mL) de las los extractos de cacao	43
<b>Gráfica 8.</b> Potencial de reducción del Hierro (FRAP) de las muestras de la línea de producción del chocolate de mesa	44
<b>Gráfica 9.</b> Potencial de reducción del Hierro (FRAP) en cuatro variedades de chocolate de mesa	45
<b>Gráfica 10.</b> Correlación lineal entre el contenido de polifenoles totales y el potencial de reducción del hierro (FRAP)	46
<b>Gráfica 11.</b> Variación de los antioxidantes totales sobre el radical ABTS <sup>+</sup> en la línea de producción del chocolate de mesa	47
<b>Gráfica 12.</b> Antioxidantes totales sobre el ABTS <sup>+</sup> en cuatro variedades de chocolate de mesa	48
<b>Gráfica 13.</b> Correlación lineal entre el contenido de polifenoles y los antioxidantes totales sobre el ABTS <sup>+</sup>	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Actividad Antioxidante
<b>A/Agua/ÁA</b>	Método de extracción con acetona/agua/ácido acético 70:29.8:0.2 v/v/v
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6))
<b>ÁG</b>	Ácido gálico
<b>AO</b>	Antioxidante
<b>AOC</b>	Capacidad Antioxidante
<b>C</b>	Chocolate clavos y canela
<b>(±)-C</b>	(±)-Catequina
<b>Ch</b>	Chocolate de mesa tradicional
<b>ChA</b>	Chocolate de mesa amargo
<b>DEP</b>	Desengrasado Éter de petróleo
<b>DHU</b>	Método de desengrasado con n-hexano y ultrasonido
<b>DPPH</b>	$\alpha,\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -Picrylhydrazyl Radical (Radical $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ - picrilhidracilo)
<b>DSH</b>	Método de desengrasado Soxhlet n-hexano
<b>E/A</b>	Método de extracción con etanol/agua 80:20 v/v
<b>(-)-EC</b>	(-)-Epicatequina
<b>EC<sub>50</sub></b>	Efficiente Concentration (Concentración eficiente)
<b>Fig.</b>	Figura
<b>FRAP</b>	Ferric reducing/antioxidant power (Potencial de reducción/antioxidante del hierro)
<b>F-C</b>	Folin-Ciocalteu
<b>g</b>	Gramo
<b>HAT</b>	Hydrogen atom transfer (Transferencia de átomo de hidrógeno)
<b>HDL</b>	High density lipoprotein(Lipoproteína de alta densidad)

<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>lb</b>	Libra
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein (Lipoproteína de baja densidad)
<b>M/A</b>	Método de extracción con metanol/agua caliente
<b>Mad</b>	Proceso de maduración del licor de cacao
<b>Mez</b>	Proceso de mezclado de licor de cacao con lecitina de soya, azúcar y saborizantes
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b>Mol</b>	Proceso de molienda de las semillas secas y fermentadas para la producción del licor de cacao
<b>MP</b>	Materia prima: semillas secas y fermentadas
<b>mtra</b>	Muestra
<b>NFCS</b>	Nonfat cocoa solid (Sólidos no grasos de cocoa)
<b>P</b>	Chocolate de mesa elaborado a partir de polvo de cacao y aceite vegetal
<b>PF</b>	Proceso de fermentación
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TAC</b>	Cantidad de antioxidantes totales
<b>TPTZ</b>	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triacina)
<b>S.A.</b>	Sociedad anónima
<b>SET</b>	Single electron transfer (Transferencia de un electrón)
<b>SE</b>	Scavenging effect (Efecto de barrido)
<b>T</b>	Proceso de tostado
<b>TE</b>	Trolox equivalents (Equivalentes Trolox)
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta - Visible

## RESUMEN

### TÍTULO:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROCESAMIENTO DEL CACAO SOBRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE<sup>1</sup>

### AUTORES:

Herrera Ardila, Yenny Mayerly. Cadena Cala, Tatiana.<sup>2</sup>

### PALABRAS CLAVE:

Cacao, chocolate, polifenoles, actividad antioxidante.

### DESCRIPCIÓN:

El contenido de polifenoles presentes en el grano de cacao, depende del tipo de grano y de los procesos de fermentación y secado a los que este es sometido, así como de las condiciones a las que se expone durante las etapas de manufactura (tostado, desengrasado, molienda y maduración).

En este trabajo se evaluó la variación del contenido total de polifenoles, de los flavonoides ( $\pm$ )-Catequina y (-)-Epicatequina y de la actividad antioxidante durante el proceso de elaboración de diferentes tipos de chocolates de mesa. Los polifenoles totales se midieron empleando el método de Folin-Ciocalteu, los flavonoides ( $\pm$ )-Catequina y (-)-Epicatequina se cuantificaron por HPLC en fase reversa y la actividad antioxidante por los métodos: *Actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)*, *Concentración efectiva media EC<sub>50</sub>*, *Ensayo espectrofotométrico de antioxidantes totales sobre el ABTS* y *ensayo de potencial antioxidante de reducción del hierro FRAP*.

Se encontró que el proceso de manufactura del chocolate de mesa, especialmente la etapa de tostado, disminuye el contenido de polifenoles totales presentes en las semillas de cacao y que entre las diferentes presentaciones de chocolate de mesa analizadas el chocolate de mesa amargo presentó el mayor contenido de polifenoles y actividad antioxidante.

---

<sup>1</sup> Trabajo de Grado

<sup>2</sup> Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora: Janeth Aidé Perea Villamil

## ABSTRACT

### TITLE:

EVALUATION OF THE PROCESING EFFECT OF COCOA ON THE CONTENT OF POLYPHENOLS AND IT'S ANTIOXIDANT ACTIVITY<sup>1</sup>

### AUTHORS:

Herrera Ardila, Yenny Mayerly. Cadena Cala, Tatiana.<sup>2</sup>

### KEY WORDS:

Cocoa, chocolate, polyphenols, antioxidant activitie.

### DESCRIPTION:

The polyphenol contents of cocoa beans, depends on the type of grain, the fermentation and dried process, and the condition wich it is exposed during the stages of manufacture (roasting, deffated, grinding and ripeness).

In this work there was evaluated the variation of the total content of polyphenols, of the the flavonoids ( $\pm$ ) Catequine and (-) Epicatequine and of the antioxidant activity during the process of production of different types of chocolates. The total polyphenols were measured using the FOLIN-CIOCAITEUS method, the flavonoids ( $\pm$ ) Catequine and (-) Epicatequine were quantified by HPLC in reverse phase and the antioxidant activity was calculated using the folowing methods: Antioxidat Activity on the radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), effective average Concentration EC50, spectrofotometric test of total antioxidants on the ABTS and the Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP).

One thought that the process of manufacture of the chocolate specially the stage of roasting, diminishes the content of polyphenols present in the cocoa beans and that among the different presentations of chocolate products analyzed the bitter chocolate (Dark chocolate) presented the major content of polyphenols and antioxidant activity.

<sup>1</sup>Research Work, Chemistry Thesis

<sup>2</sup>Universidad Industrial de Santander, Faculty of science, Department of Chemistry. Directed by: Janeth Aidé Perea Villamil

## INTRODUCCIÓN

El cacao se ha caracterizado por ser uno de los principales productos agrícolas de Colombia y aunque su cultivo se realiza a nivel de pequeños agricultores, este trae grandes beneficios para el campesino ya que constituye una alternativa económica y sostenible para la explotación agrícola del trópico colombiano.

Además del cultivo, la manufactura de productos de chocolate es importante, siendo uno de los productos más representativos el chocolate de mesa, cuyo consumo per cápita fue estimado en 0,9 kg/año en el estudio realizado por el DANE y CAOBISCO en el 2002. El cacao también es una materia prima importante para la industria de chocolatería y confitería, así como para la industria farmacéutica, en éste caso por la aplicación de la manteca de cacao en la elaboración de cosméticos.

Por su participación en varios sectores de la economía y además por ser un alimento de consumo habitual, es necesario conocer su composición para evaluar los beneficios que este ejerce sobre la salud, teniendo en cuenta que es un producto rico en polifenoles, principalmente flavonoides, entre los que se destacan la ( $\pm$ )-Catequina, (-)-Epicatequina y sus oligómeros las procianidinas.

Recientemente se ha evidenciado que los flavonoides del cacao y sus derivados intervienen en la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas, ya que estas sustancias actúan como antioxidantes que protegen las células frente a la acción de los radicales libres y frente a especies degenerativas, previniendo así la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Holleberg et al., 2007).

El contenido de polifenoles del grano de cacao y su actividad antioxidante, sin embargo, pueden depender del tipo de grano y de los procesos de fermentación y secado a los que es sometido, así como de las condiciones a las que se expone

durante su manufactura. En el caso del chocolate de mesa, etapas como el tostado, desengrasado, molienda, maduración, atemperado y finalmente la mezcla con otros ingredientes, pueden alterar el contenido de polifenoles presentes inicialmente en la semilla, así como la actividad antioxidante de los mismos.

Por lo anterior, en este proyecto se evaluó el efecto del procesamiento del grano de cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Se seleccionó el proceso de elaboración de chocolate de mesa en diferentes presentaciones: chocolate amargo, chocolate con azúcar, chocolate clavos y canela, chocolate elaborado a partir de polvo de cacao y aceite vegetal, productos fabricados por la empresa Gironés S.A.

Se encontró que etapas como el tostado disminuyen el contenido de polifenoles presentes en las semillas de cacao y que entre los productos analizados en este proyecto el que mayor contenido de polifenoles y mayor actividad antioxidante presentó fue el chocolate amargo. Además que el chocolate es una fuente muy importante de antioxidantes naturales presentado valores similares a los del té verde y superiores a los de frutas como la manzana, la pera y el kiwi.

Resultados parciales del trabajo realizado fueron presentados en el IX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2008) y han sido aceptados en la XI Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA-11): IV Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Cacao y Chocolate.

Para este proyecto se contó con recursos propios provenientes del Centro de Investigación y Ciencia y Tecnología de Alimentos adscrito a la Escuela de Química y el apoyo de la empresa Gironés S.A. quien suministró las muestras.

## **1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

Las biomoléculas están propensas a sufrir procesos de oxidación que son de vital importancia para la célula, pero que también ocasionan efectos colaterales como la producción de radicales libres y otras especies de oxígeno reactivas que originan diversos daños al organismo (Pratico y Delanty, 2000) ya que bloquean las enzimas protectoras como la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa además de causar efectos destructivos letales en la célula por oxidación de los lípidos de la membrana, proteínas celulares, DNA y enzimas.

El estrés oxidativo en los humanos se desarrolla por un desbalance entre las especies de oxígeno reactivo y los mecanismos de defensa y reparación. Entre las defensas endógenas están las enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, además de sustancias no enzimáticas como la vitamina E, el ácido úrico y las albúminas que actúan como antioxidantes y que generalmente se encuentran en los alimentos (Antolovich et al., 2002).

Consecuencia del estrés oxidativo se generan múltiples enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades del corazón, artritis, patologías respiratorias, disfunción cerebral, aceleración del envejecimiento, diabetes arteriosclerosis, enfermedades del sistema nervioso como Parkinson, Alzheimer, Isquemia, traumatismos craneales, daños relacionados con las estructuras oculares como cataratas y daños de la retina (Amin et al., 2004). Por lo anterior, hoy día se está recomendado el consumo de antioxidantes provenientes principalmente de fuentes naturales como los alimentos.

### **1.1 ANTIOXIDANTES**

Halliwell (1990) define un antioxidante como una sustancia que cuando está presente en baja concentración comparada con los sustratos oxidables, inhibe o

retrasa la oxidación de este sustrato significativamente. Estos compuestos se han dividido por conveniencia en tres clases:

- Enzimáticos o no enzimáticos: según su naturaleza química
- Primarios, secundarios o terciarios: Según su función.
- Endógenos o exógenos: En dependencia de que sean sintetizados por la célula o ingresen a través de la cadena alimenticia.

Los antioxidantes pueden ser de origen natural o sintético. Los antioxidantes sintéticos más usados son el butilhidroxi anisol (BHA), butilhidroxi tolueno (BHT), terbutil hidroquinona (TBHQ) y los galatos, sin embargo en los últimos años se ha promovido el uso de antioxidantes naturales por las implicaciones negativas que en la salud han tenido estos compuestos. Algunos antioxidante naturales bien conocidos son vitamina C, vitamina E, beta-carotenos, flavonoides y zinc (Vázquez et al., 1998).

Alimentos como frutas, vegetales, té, vino y granos como el cacao son conocidos por contener una alta variedad de compuestos antioxidantes que incluyen compuestos fenólicos (Imeh y Khokhar, 2002). Las semillas de cacao y sus productos (licor de cacao, polvo de cacao y bebidas de chocolate), son ricos particularmente en catequinas y procianidinas (Nazaruddin, 2006; Kim y Keeney, 1994) compuestos que han recibido gran atención debido a sus funciones fisiológicas, entre las que se encuentran su función antioxidante, antimutagénica y antitumoral (Kono et al., 1995).

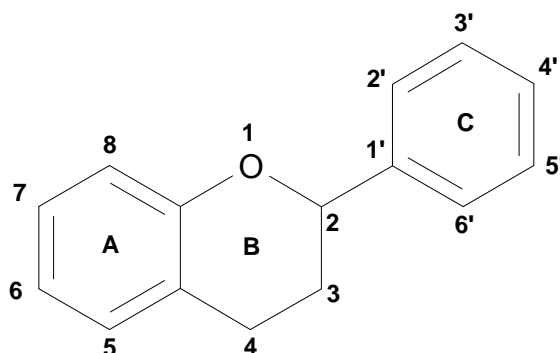
## **1.2 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS**

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Estos compuestos actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosas y ampliamente distribuidas en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras ampliamente conocidas y pueden ser divididos en al menos 10 clases diferentes dependiendo de su estructura básica.

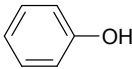
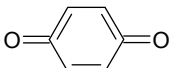
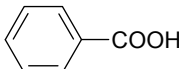
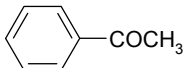
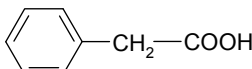
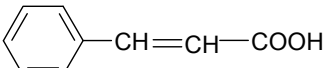
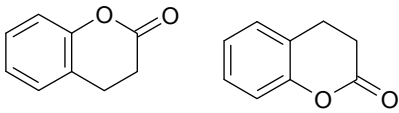
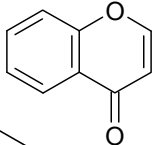
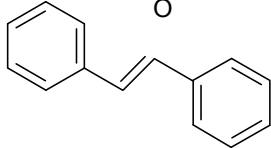
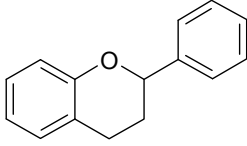
En la **Tabla 1** se ilustran las estructuras básicas de los compuestos polifenólicos más representativos (Bravo, 1998), de estos los flavonoides constituyen uno de los grupos más importantes y se agrupan en 13 clases con más de 5000 compuestos. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos ya que actúan como colorantes, saborizantes y antioxidantes (Gimeno, 2004). En la **Figura 1** se presenta la estructura básica de los flavonoides:

**Figura 1.** Estructura básica de los flavonoides



Los flavonoides, especialmente los flavan-3-ols ( $\pm$ )-Catequina, (-)-Epicatequina, Galactocatequina y (-)-Epigallocatequina, son los constituyentes monoméricos de los taninos condensados (Herrmann, 1995; Bravo, 1998), compuestos fácilmente hidrolizables que poseen altos pesos moleculares y que son insolubles en solventes orgánicos acuosos.

**Tabla 1.** Principales compuestos polifenólicos

Clase	Esqueleto básico	Estructura básica
Fenol simple	C <sub>6</sub>	
Benzoquinona	C <sub>6</sub>	
Ácido fenólico	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>	
Acetofenona	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>	
Ácido fenilacético	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>	
Ácido hidroxicinámico	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	
Coumarinas, isocoumarinas	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	
Cromones	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	
Estilbenos	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub>	
Flavonoides	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub>	

Bravo (1998)

Las antocianinas son el grupo de compuestos monoméricos más importantes entre todos los pigmentos vegetales hidrosolubles, siendo los responsables del color de

las plantas, las flores y los frutos. Las antocianinas y otros pigmentos poliméricos formados por la condensación de estos compuestos con otros flavonoides son los responsables de el color del vino tinto (Bravo, 1998).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por sus propiedades antioxidantes son susceptibles a ser oxidados y además impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes. Pueden además actuar como quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales (Kinsella, 1993).

### **1.3 CACAO**

El grano de cacao consta de una cáscara o cubierta (Testa) que representa del 10-14% del peso del cacao seco y de una almendra (Cotiledón) que constituye casi la totalidad del peso restante (86-90%). El cotiledón está compuesto por dos tipos de células de almacenamiento parenquimal, las células polifenólicas que contienen vacuolas llenas de polifenoles y alcaloides y las células lipoproteínicas. Las células polifenólicas constituyen el 10% del grano. El cotiledón a su vez se encuentra rodeado de una pulpa mucilaginoso espesa de sabor agrídulce rica en azúcares (Bolaños y Peñaranda, 1990).

Para eliminar el mucílago y dejar libre el cotiledón es necesario someter el grano a un proceso de beneficio que comprende tres etapas:

- **Recolección y desgrane de la mazorca:** La recolección se inicia cuando se ha alcanzado el grado óptimo de maduración de la mazorca (cambio de coloración) y el desgrane que consiste en extraer las semillas de la misma.

- **Fermentación:** Este proceso tiene como objetivo desprender los granos del mucílago para facilitar su conservación, provocar la muerte del embrión y prevenir la germinación, y por último, originar las reacciones bioquímicas que dan origen a la formación de los precursores del aroma y el sabor de cacao (Jinap, 1994).

El proceso de fermentación ocurre en dos etapas, una anaeróbica y otra aeróbica. En la primera etapa los microorganismos presentes en el medio atacan la pulpa hidrolizando azúcares, carbohidratos y proteínas para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y péptidos de bajo peso molecular. En la segunda etapa de fermentación, la fase aeróbica, el etanol formado se convierte en ácido acético el cual penetra el cotiledón y causa la muerte del grano.

Durante la fermentación ocurre la eliminación más significativa de polifenoles solubles, que son reducidos aproximadamente al 10-20% (Herman, 1995; Kim, y Keeney, 1994; Luna, 2002). Dicha pérdida ocurre a través de la eliminación de líquidos drenados producto de la fermentación (Wollgast y Anklan, 2000) o por la acción de la enzima polifenol oxidasa que se encarga de oxidar los polifenoles a polifenoles condensados insolubles de alto peso molecular, conocidos como taninos (Kim y Keeney, 1984; Hansen et al., 1998, Weisburguer, 2001). La frecuencia de las reacciones de condensación de los polifenoles se evidencia en la reducción del contenido de (-)-Epicatequina entre el primero y segundo día de fermentación (Hansen et al., 1998).

Durante la etapa de fermentación otros compuestos como las antocianinas son hidrolizados a antocianidinas, las cuales se polimerizan con las catequinas simples para formar taninos complejos. Las antocianinas por lo general se eliminan rápidamente durante los primeros cuatro días de fermentación (93%) (Shaidi y Naczk, 1995).

- **Secado:** Los métodos de secado al sol o secado natural y secado artificial se realizan para asegurar la conservación del cacao reduciendo el contenido de humedad del grano hasta un 6-7%. En esta etapa el pH del cotiledón aumenta como

consecuencia de la eliminación del ácido acético y otros ácidos volátiles presentes en la superficies de la testa y de la aceleración de las reacciones de oxidación por el incremento del contenido de oxígeno en el tejido expuesto de los granos (Tomlins et al., 1993). Aquí, son de gran importancia las oxidaciones no enzimáticas de los polifenoles, como lo establecieron Hensen et al., (1998) quienes encontraron una disminución del 50% del contenido de (-)-Epicatequina. La pérdida de estos polifenoles se evidencia en la disminución de la astringencia y el sabor amargo de los chocolates, como lo reporta la investigación realizada por Nazaruddin (2006).

#### **1.4 PROCESO DE MANUFACTURA DEL CHOCOLATE**

Las semillas de cacao fermentadas y secas son sometidas a diferentes procesos de manufactura, sin embargo, se puede describir un proceso general que involucra: la limpieza, el tostado, la trituration, descascarillado y molienda de las nueces; así como el desengrasado, amasado, refinamiento, moldeo y almacenamiento del chocolate.

- Limpieza de la nuez: envuelve la eliminación principalmente de contaminantes físicos como piedras, metales, residuos de madera y de granos pequeños y semillas sin madurar a las que comúnmente se les conoce como pasilla (Minifie, 1989).
- Tostado de la nuez: En esta etapa se dan las reacciones necesarias para la formación de los compuestos que finalmente determinan el aroma, sabor y color característico del grano de cacao. El tiempo de tostado puede variar de 5 a 120 min, y la temperatura entre 120 y 150 °C. El tostado se realiza en dos pasos: un pretostado a 100 °C, seguido de un calentamiento a temperaturas por encima de 130 °C (Lange y Fincke, 1970; Kealey et al., 1998), usando aire caliente, vapor saturado y radiación infrarroja entre otros métodos (DNP, 2004).
- Trituración y descascarillado: En el proceso de trituration se busca disminuir el tamaño de la almendra de cacao, obteniéndose fracciones de almendra

separables entre si por medios mecánicos. En esta etapa por diferencia de densidad y aplicando una corriente de aire se separa también la cascarilla.

- Molienda de la nuez: La molienda se lleva a cabo usando rodillos estriados o molinos, hasta conseguir una masa fina y homogénea que se conoce como pasta o “licor” de cacao (Kealey et al., 1998; DNP, 2004).

- Desengrasado. La separación de la manteca de cacao se realiza mediante un proceso de prensado y amasado (Camargo 2002), dicha manteca tiene un alto valor comercial ya que se utiliza en la industria cosmética y farmacéutica. Al separar la manteca de cacao se obtiene además la torta de cacao o sólidos de cacao.

La torta de cacao separada en el paso descrito anteriormente, después de ser enfriada, se tritura para obtener el cacao en polvo o cocoa que se utiliza en la producción de materiales de recubrimiento, relleno, preparaciones prefabricadas de pastelería, polvos para bebidas o como producto final.

- Amasado: Es el proceso de mezclado y refinado de la pasta de cacao con otros ingredientes según la formulación deseada.

- Refinamiento, conchado y atemperado: Procesos a partir de los cuales se obtiene la textura y viscosidad necesarias para producir un chocolate con buenas características de fusión, dureza y adecuada sensación al paladar.

- Moldeo: Proceso en el cual el chocolate atemperado pasa a las salas de moldeo para generar los diferentes tipos de productos que son posteriormente liberados al mercado (DNP, 2004).

- Almacenamiento.

La alcalinización de las semillas, licores o nueces con soluciones o suspensiones de álcalis se efectúan principalmente para cambiar el color de los productos, es un paso

adicional pero que no es indispensable en el proceso de manufactura del chocolate (Lange y Fincke, 1970).

## 1.5 PRODUCTOS DE CHOCOLATE

Los productos de la industria de chocolates son presentados en diferentes formas como: bloques, tabletas, barras, barritas, pastillas, croquetas, granulados, polvo y pueden ser ingredientes de otros productos como bombones rellenos de cremas, frutos, licores, entre otros. Hace parte de estos productos el chocolate de mesa que es distribuido en forma de pastillas y que se puede encontrar en varias presentaciones como chocolate de amargo, chocolate de mesa con azúcar y/o con diferentes saborizantes como el clavo la canela y la vainilla (DNP, 2004). En Colombia el chocolate de mesa participa con un 46% del mercado, siendo el principal producto de las compañías medianas y pequeñas dedicadas a la transformación del cacao (DNP, 2004).

## 1.6 POLIFENOLES EN CACAO Y SUS PRODUCTOS

Los polifenoles existen como ingredientes intrínsecos en el cacao por lo cual sus derivados son considerados alimentos funcionales que aportan beneficios a la salud de los consumidores de forma similar a otros productos como el vino rojo, el té verde y el té negro (Zumbé, 1998). En la **Tabla 2**, se relacionan los tipos de polifenoles presentes en las semillas de cacao (Herrmann, 1995; Sanbongi et al., 1998) encontrándose que los más comunes son los flavan-3-ols catequinas, (-)-Epicatequina y procianidinas poliméricas y oligoméricas conformadas por subunidades de (-)-Epicatequina. (Croft et al., 2000; Donovan et al., 1999; Richelle et al., 1999; Waterhouse et al., 1996).

La cantidad de polifenoles solubles encontrados en la semillas secas y libres de grasa oscila entre el 15-20% y están constituidos por un 37% de catequinas, un 4%

de antocianinas y un 58% de proantocianidinas. La (-)-Epicatequina es la catequina que se encuentra en mayor proporción conformando el 35% del total de polifenoles (Kim y Keeney, 1984).

**Tabla 2.** Contenido polifenólico en semillas de cacao

<b>Catequinas</b>	<b>Antocianinas</b>	<b>Procianidinas</b>	<b>Flavonol Glicosídico</b>
(-)-Epicatequina	Cianidina-3- $\alpha$ -l-arabinosa	Procianidina B1	Quercetina-3-O- $\alpha$ -d-arabinosa
(+)-Catequina	Cianidina-3- $\beta$ -d-galactosa	Procianidina B2	Quercetina-3-O- $\beta$ -d-glucopiranososa
(+)-Galocatequina		Procianidina B3	
(-)-Epigalocatequina		Procianidina B4	
		Procianidina B5	
		Procianidina C1	

Urbanski (1992)

En los últimos diez años el estudio de los polifenoles del cacao ha cobrado importancia y se ha centrado en estudiar su contenido y variación en semillas de cacao fermentadas y en productos de chocolate como el licor de cacao.

Es escasa la información reportada sobre los cambios del contenido de polifenoles del cacao durante su procesamiento (Wollgast y Anklam, 2000), por lo que no es claro qué cantidades de estos compuestos quedan en los productos finales que llegan al consumidor. Se ha sugerido, que en la manufactura del chocolate, especialmente durante el tostado, la molienda, el refinado y el conchado, se presentan cambios en la composición de los polifenoles debido a las altas

temperaturas aplicadas (Kealey et al., 1998) y a la presencia de oxígeno (Wollgast y Anklam, 2000).

En el 2004 Wollgast reportó que en la fermentación, el tostado y el alcalinizado (sí se realiza) hay pérdida y cambio en el perfil de los polifenoles desde la semilla hasta el producto de chocolate elaborado. Además, estos autores encontraron que las procianidinas oligoméricas son los compuestos más susceptibles a la degradación oxidativa, epimerización y deglicosidación y las consideran responsables de los cambios observados a lo largo del proceso. Adamson (1999) mostró el efecto causado por el grado de fermentación sobre productos como el “licor” de cacao, debido a la disminución del nivel de procianidinas que a su vez causa disminución en la actividad antioxidante por la pérdida de dichos compuestos.

Durante las etapas de tostado y alcalinización, se presenta además una pérdida significativa de (-)-Epicatequina y de procianidinas B2 y C1 que son los compuestos más abundantes, en tanto que el contenido de (±)-Catequina y quercitina aumentan. Lo anterior puede deberse a la epimerización de la (-)-Epicatequina hacia (±)-Catequina no-epi (Wang y Helliwell, 2000), mientras que el aumento en el contenido de quercitina puede explicarse por los procesos de deglicosilación de los glicósidos de quercitina a quercitina aglicon (Tanaka et al., 2000).

Al evaluar “licor de cacao ecuatoriano”, Counet y Christine (2006) demostraron que el contenido de polifenoles está relacionado con diversas propiedades organolépticas de la semilla como: astringencia, aroma, acidez, amargor y presencia de alcaloides como la teobromina.

En uno de los estudios más recientes, Alorio y colaboradores (2007), encontraron que el tostado es la etapa que tiene mayor influencia sobre el contenido de polifenoles y de sustancias como la clovamida que también posee actividad antioxidante.

En cuanto a los productos de cacao el cambio en el contenido fenólico y su actividad antioxidante fue evaluado por Gu et al., (2006), quienes determinaron procianidinas y catequinas en diferentes tipos de productos, encontrando que el polvo de cacao natural y los chocolates negros sin azúcar presentan mayores niveles de procianidinas comparados con los chocolates blancos y que la actividad antioxidante de estos productos (determinada mediante el método de ORAC<sub>HL</sub>) está directamente relacionada con el contenido de estos compuestos.

En este mismo año Kenneth et al., (2006) determinaron la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles y procianidinas de diferentes productos de chocolate distribuidos en el mercado de los Estados Unidos, encontrando que el contenido de polifenoles, procianidinas y la actividad antioxidante guarda una relación lineal con el contenido de sólidos de cacao no grasos (NFCS). Así por ejemplo, el polvo de cacao que es el producto que tiene un mayor contenido de NFCS presenta a su vez el mayor contenido de polifenoles y la mayor actividad antioxidante. En segundo lugar se encontró el licor de cacao puro, que contiene los siguientes niveles más altos de flavonoides, seguido de los chocolates blancos y jarabes de chocolate que contienen las menores cantidades de flavonoles debido a las pequeñas cantidades de NFCS presentes en estos productos. Este estudio también permitió concluir que las diferencias en el contenido de flavonoles y antioxidantes entre diferentes marcas de un mismo producto son mínimas.

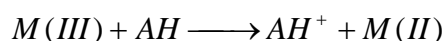
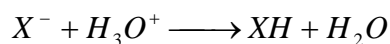
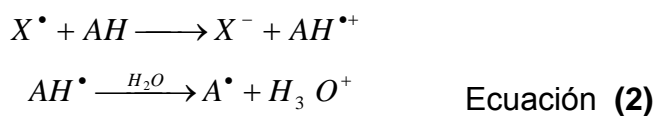
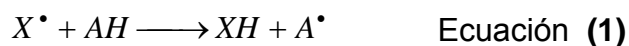
Con respecto al efecto de los antioxidantes del cacao sobre la salud, numerosos estudios han demostrado que su consumo y el de productos de chocolate aportan grandes beneficios a los seres humanos. Entre los hallazgos más recientes están los reportados por los investigadores de la Universidad de Harvard, (Hollemborg et al., 2007) quienes afirman que los indios Kuna de Panamá, presentan bajos niveles de enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades coronarias y diabetes, debido al consumo de 40 tazas de chocolate semanales. Particularmente todos estos efectos saludables se atribuyen a la (-)-Epicatequina.

## 1.7 MEDICIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación cuantitativa de los polifenoles totales en cacao y sus productos incluyen su medición por el método de Folin-Ciocalteu o la cuantificación por HPLC de (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y en algunos casos del contenido de procianidinas tipo  $\beta$ .

El método de Folin-Ciocalteu, es simple, sensible y preciso sin embargo la reacción es lenta a pH ácido y específica a pH básico. Singleton y Rossi (1965) desarrollaron los parámetros necesarios para la obtención de datos reales, como la relación de volumen entre el reactivo de F-C y la base, el tiempo y la temperatura de reacción la longitud de onda y el uso de ácido gálico como patrón estándar. Investigaciones recientes han utilizado el método de F-C variando el uso del ácido gálico por equivalentes de ( $\pm$ )-Catequina, ácido tanínico, ácido clorogénico, vainillínico y equivalente de ácido felúrico como patrones (Prior et al., 2005).

La determinación de la actividad antioxidante se basa en ensayos con dos tipos de mecanismos de reacción: (1) HAT: ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno (Ecuación 1) (Wright et al., 2001) y (2) SET: Ensayos basados en reacciones de transferencia de un solo electrón que posee el potencial para reducir algún compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales (Ecuación 2).

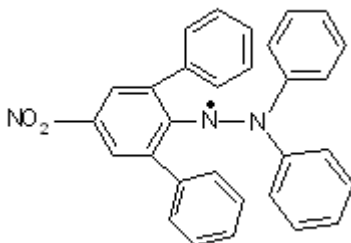


Los ensayos tipo SET involucran reacciones redox con el oxidante mientras que los ensayos con reacciones tipo HAT, monitorean la cinética de la reacción. Los métodos tipo HAT generalmente emplean sustancias generadoras de radicales libres, una molécula oxidable de prueba y un antioxidante (Wright et al., 2001), estas reacciones son rápidas y dependientes del pH, mientras que las reacciones de transferencia de electrones son lentas; por esta razón las mediciones tipo SET se basan más en el decrecimiento de un producto que en su cinética. Los polifenoles reductores pueden ser detectados fácilmente por ensayos con este tipo de mecanismos (Huang et al., 2005).

Entre las pruebas que utilizan reacciones tipo HAT se encuentran el ORAC y el TRAP y entre los que utilizan mecanismos tipo SET se encuentran FRAP y CUPRAC, entre otros. Existen métodos en los cuales se aplican los dos tipos de mecanismos como el ABTS<sup>+</sup> y el DPPH.

**1.7.1 Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).** El radical DPPH es uno de los pocos radicales orgánicos estables del nitrógeno (**Figura 2**) y está relacionado con las reacciones de peroxidación lipídica. Este ensayo se basa en la medida de la habilidad reductora de los antioxidantes sobre el radical DPPH, habilidad que se evalúa por la medida del decrecimiento de su absorbancia medida a 515 nm, después de reaccionar con los compuestos ensayados (Brand-Williams et al., 1995).

**Figura 2.** Estructura del radical DPPH



Aunque se cree que en el ensayo de DPPH la reacción ocurre por un mecanismo de transferencia de átomos de hidrogeno, recientemente Foti et al., (2004) reportaron que la reacción ocurre por un mecanismo tipo SET, ya que el paso determinante de la velocidad de reacción es un proceso rápido de transferencia de electrones del anión peróxido al DPPH, mientras que la abstracción del átomo de hidrogeno del ArOH neutral por parte del DPPH sería una ruta secundaria muy lenta.

Aunque el ensayo de DPPH es técnicamente simple y ampliamente usado, la alta estabilidad del reactivo comparada con la de los radicales peróxido involucrados en las reacciones de peroxidación lipídica dificulta la medición (Huang, D et al., 2005).

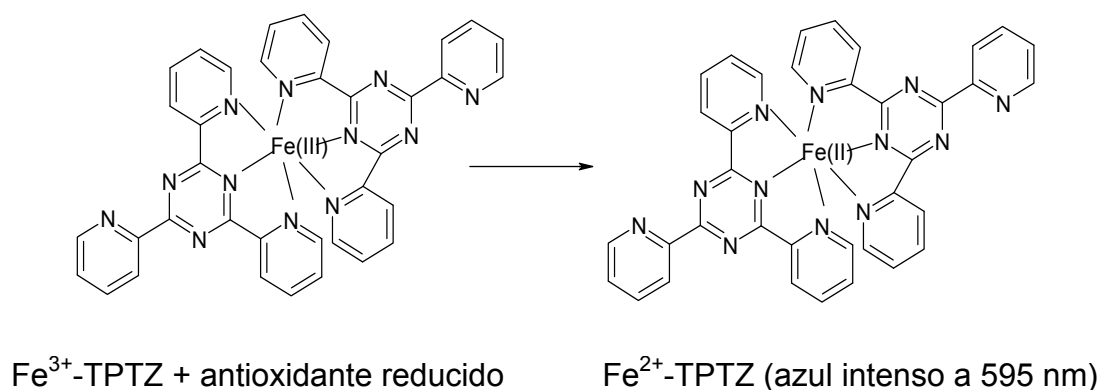
El efecto de eliminación que tienen las sustancias antioxidantes sobre el radical DPPH suele calcularse midiendo el nivel de atrapamiento del radical por parte del antioxidante que se expresa como porcentaje de DPPH remanente (%) después de transcurrida la reacción y como concentración efectiva media  $EC_{50}$ .

**1.7.2 Ensayo de potencial antioxidante de reducción del hierro FRAP.** Este ensayo basado en la reacción de reducción de  $Fe^{3+}$ -TPTZ (**Figura 3**) ocurre también por el mecanismo de transferencia de electrones ET y fue descrito inicialmente por Bezie y Strain en 1996 para medir la habilidad de reducción del hierro en el plasma.

En el ensayo de FRAP se realiza a pH 3,6 y temperatura de 37 °C para favorecer el desarrollo de la coloración por parte del reductor (antioxidante) y un exceso de  $Fe^{3+}$  que hace que el factor limitante de la velocidad de reacción  $Fe^{2+}$ -TPTZ y de la formación del color sea la habilidad reductora de la muestra la cual se monitorea como el cambio en la absorbancia  $\Delta A_{593nm}$ . (Benzie y Strain, 1996).

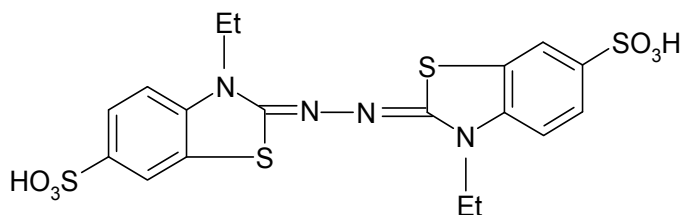
Este método colorimétrico permite detectar los compuestos con potenciales de reducción menores de 0.7 V, haciéndolo útil para medir el potencial de reducción en relación con el grado de hidroxilación de los polifenoles. Sin embargo, los resultados pueden variar dependiendo del tiempo del análisis por lo cual la reacción debe proceder en un tiempo entre 4 min y 30 min (Prior et al., 2005).

**Figura 3.** Reacción del ensayo de FRAP



**1.7.3 Ensayo espectrofotométrico de antioxidantes totales sobre  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .** El ensayo  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  o TEAC fue reportado por primera vez por Miller y Rice – Evans en 1995, quienes se basaron en la capacidad de “barrido” de los antioxidantes sobre el anión radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (**Figura 4**). En este ensayo el ABTS es oxidado por los radicales peróxido u otros oxidantes generando el radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , el cual posee un color verde intenso.

**Figura 4.** Estructura del 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico)  $\text{ABTS}^{\bullet+}$



El radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las antocianinas por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos

coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. (Kuskoski y Asuero, 2004).

En el presente trabajo se emplea el método de Folin-Ciocalteu para la determinación de polifenoles totales y los métodos de DPPH, FRAP y ABTS para medir actividad antioxidante. Adicionalmente se emplea la cromatografía HPLC para hacer la determinación de ( $\pm$ )-Catequina y (-)-Epicatequina.

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

**2.1.1 Reactivos.** Para el desarrollo del proyecto se emplearon: n-hexano, Reactivo de Folin-Ciocalteu, Éter de petróleo, etanol, acetona, ácido acético glacial, cloroformo, acetato de etilo, acetato de sodio, tricloruro de hierro trihidratado, bicarbonato de sodio, sulfato de hierro heptahidratado, ácido clorhídrico fumante, ácido ascórbico, Trolox , ácido gálico, ABTS, TPTZ , DPPH, Metanol, ácido acético y agua grado HPLC. Todos los reactivos grado analítico.

**2.1.2 Equipos y material de laboratorio.** Los materiales y equipos de laboratorio utilizados fueron: medidor de pH HI 223 marca Hanna Instruments, 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, Soxhlet marca E&Q Electrónica y Química, Estufa marca Binder, rotaevaporador marca Heidolph, agitador vibrador para tubos de ensayo marca Schott Gerate, espectrofotómetro Genesys 20 marca ThermoSpectronic y termostato U15 marca MLW.

**2.1.3 Muestras.** Las muestras fueron tomadas en la empresa Gironés S.A, especializada en la manufactura de chocolates de mesa. Para el muestreo se siguió el procedimiento desarrollado por Wollgast (2004). Las cantidades de muestra tomadas se presentan en la **Tabla 3**.

Las muestras se obtuvieron en tres épocas diferentes del año y en cada una de las etapas de la línea de producción de chocolate amargo (**ChA**), chocolate tradicional (con azúcar) (**Ch**), y chocolate clavos y canela (**C**) que comprende: **a)** entrada de la materia prima consistente en semillas de cacao secas y fermentadas (**MP**), **b)**

tostado de las semillas **(T)** a 160 °C , **c)** molienda de las semillas tostadas **(Mol)** para obtener el licor de cacao, **d)** maduración **(Mad)** del licor de cacao para obtener el chocolate amargo y finalmente **e)** el mezclado **(Mez)** del licor de cacao madurado con lecitina de soya, azúcar y saborizantes **f)** atemperado y moldeo para elaborar el chocolate con azúcar y el chocolate clavos y canela.

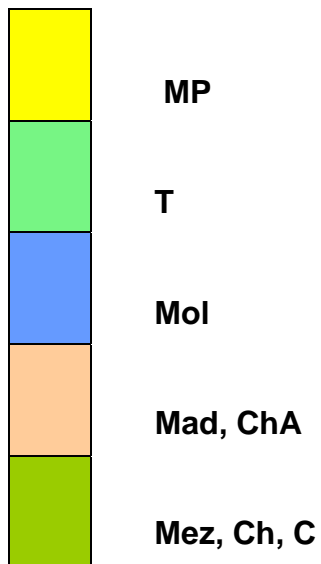
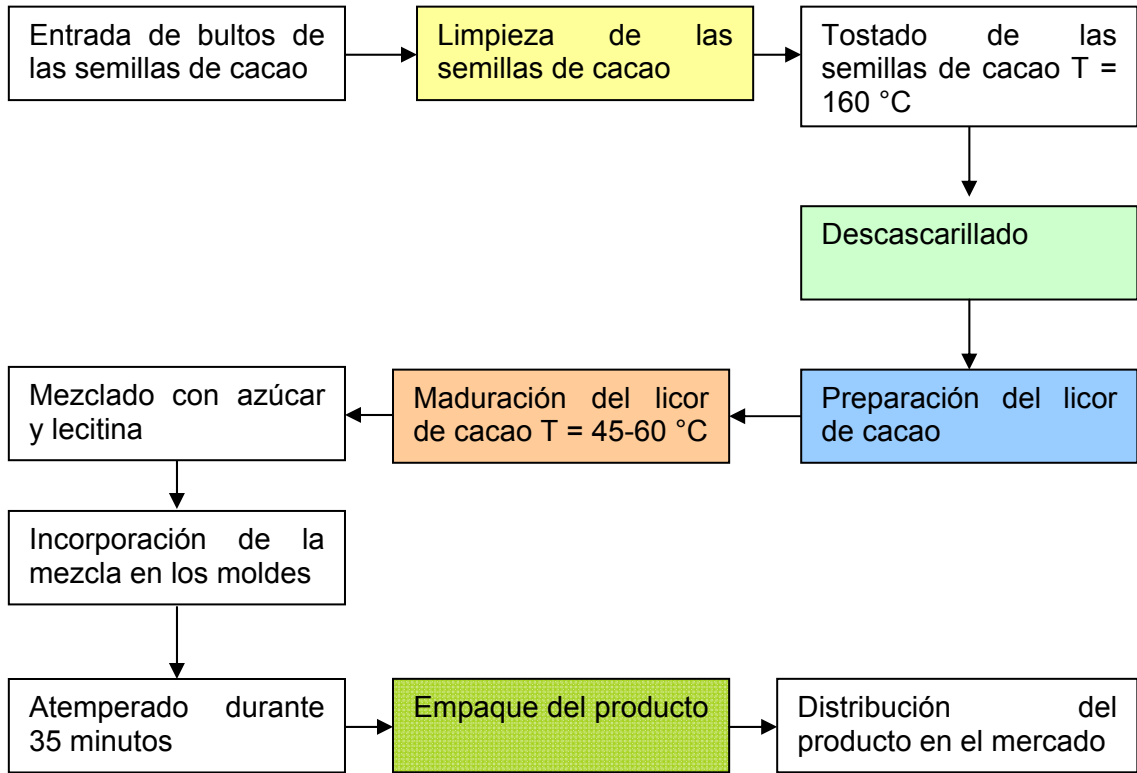
Adicionalmente se realizaron tres muestreos de un producto elaborado en la fábrica a partir de polvo de cacao y aceite vegetal **(P)**.

**Tabla 3.** Cantidades de muestras recolectadas en la fábrica

<b>Muestra</b>	<b>Cantidad de muestra</b>
Semilla seca y fermentada	2 muestras de 200 g a partir de sacos de cacao de 20 kg
Semilla tostada y descascarillada	2 muestras de 200 g
Licor sin madurar	2 muestras de 10 g
Licor maduro (chocolate amargo)	2 muestras de 10 g
Producto tradicional	1 lb de producto terminado y empacado
Producto a partir de polvo de cacao	1 lb de producto terminado y empacado
Producto Clavos y canela	1 lb de producto terminado y empacado

Las abreviaturas señaladas anteriormente se utilizarán en adelante para nombrar las muestras correspondientes a las etapas del proceso y a los productos. En la **Figura 5**, se presenta la secuencia del proceso llevado a cabo en la fábrica para la elaboración del chocolate de mesa, identificándose con diferentes colores los puntos de muestreo.

**Figura 5.** Proceso de manufactura del chocolate de mesa tradicional en la fábrica Gironés S.A. y zonas de muestreo



Las muestras tomadas en la fábrica se llevaron al laboratorio en donde se realizó el siguiente tratamiento de muestreo y homogenización:

- Las semillas secas y fermentadas, se descascarillaron y se mezclaron para posteriormente moler 200 g de muestra. A la muestra molida se le realizó un proceso de cuarteo hasta llegar a una muestra representativa de 1 g.
- Las semillas tostadas se unificaron y se tomaron 200 g de muestra, los cuales fueron molidos y sometidos al proceso de cuarteo hasta obtenerse 1 g de muestra.
- Las muestras de licor de cacao madurado (Chocolate amargo) y sin madurar, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para obtener un producto sólido y posteriormente se tomaron muestras de 1 g.
- Para los diferentes chocolates de mesa se partió de una pastilla de producto de 25 g, se maceró y se tomó una muestra de 1 g.

## 2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DESENGRASADO

Para establecer las condiciones óptimas de desengrasado y extracción de las muestras, se empleó un diseño experimental de tipo *Factorial de nivel 3<sup>2</sup>*, empleando para su análisis la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico **STATGRAPHICS CENTURION XV** para Windows, el cual permitió establecer el efecto de las variables independientes y sus interacciones sobre el contenido de polifenoles totales.

En la **Tabla 4**, se presentan las variables independientes con sus respectivos códigos de nivel empleados para el diseño experimental.

**Tabla 4.** Variables independientes y niveles de diseño

Variables independientes	Símbolo	Código de los niveles		
		-1	0	1
Método de desengrasado	<b>D</b>	DEP	DSH	DHU
Método de extracción	<b>E</b>	A/Agua/ÁA	A/E	A/M

Donde:

**DEP, Desengrasado en Soxhlet con Éter de petróleo:** desarrollado siguiendo el método sugerido por Buchelli P (2002).

**DSH, Desengrasado en Soxhlet con n-Hexano:** aplicando el método estandarizado A.O.A.C 7.060/84.

**DHU, Desengrasado con n-Hexano y baño ultrasónico:** realizado según el procedimiento propuesto por Wollgast J (2004).

**A/Agua/ÁA, Acetona/agua/ácido acético 70:29.8:0.2. v/v/v :** realizado según lo propuesto por Wollgast (2004).

**A/E, Extracción con Etanol/agua (80:20 v/v):** Las muestras se extrajeron según el método sugerido por Otham, A (2007).

**A/M, Agua caliente/metanol (A/M):** Para está extracción, se siguió el método propuesto por Lacueva (2005).

En la **Tabla 5** de la sección de resultados se presentan los 27 puntos arrojados por el diseño experimental.

## 2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

**2.3.1 Determinación del contenido de humedad y grasa de las muestras.** Con el fin de calcular el peso en base seca de las muestras analizadas y el contenido de grasa total de las mismas, se realizaron mediciones de grasa y humedad. Además se cuantifico el porcentaje de grasa extraído por el método de desengrasado con n-hexano y baño ultrasónico.

Para la medición de la humedad se siguió el método estandarizado descrito por la A.O.A.C 7.003/84 y 930.15/90 adaptados, y para la Grasa el método estandarizado A.O.A.C 7.060/84.

**2.3.2 Preparación de extractos.** Los extractos polifenólicos de las diferentes muestras se prepararon por duplicado, las muestras previamente homogenizadas se desengrasaron con n-hexano en baño ultrasónico y posteriormente se extrajeron usando Etanol/Agua 80:20. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos ámbar bajo refrigeración por un tiempo no superior a 5 días.

**2.3.3 Ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C).** El ensayo de F-C para la determinación de polifenoles totales se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Wollgast (2004). 50  $\mu$ l de extracto y 1,5 ml de reactivo de Folin diluido diez veces se mezclaron en un tubo de ensayo y después de 5 min se adicionaron 1,5 ml de carbonato de sodio 7,5%. Los tubos se guardaron en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente, seguidamente se leyó la absorbancia de las muestras a 765 nm en el espectrofotómetro, usando como blanco una mezcla del reactivo y agua.

El ácido gálico fue usado como patrón de referencia para realizar la curva de calibración (ANEXO 1) con diluciones entre 1,8 y 0,2 mg/ml. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico sobre gramos de muestra en base seca (mgÁG/g).

**2.3.4 Medición de la Actividad antioxidante.** La actividad antioxidante de cada uno de los extractos obtenidos se analizó de acuerdo a la habilidad de atrapamiento de radicales usando el método de DPPH y ABTS<sup>+</sup> y al potencial de reducción usando el método de FRAP.

Las mediciones de AOC por cada uno de los métodos se compararon contra estándares de referencia de conocida actividad antioxidante como el Trolox el ácido ascórbico, el ácido gálico y el Fe<sup>2+</sup> en el caso de FRAP.

- **Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH):** El efecto antioxidante de los extractos de cacao y de las sustancias de referencia sobre el radical DPPH, se analizó de acuerdo al método propuesto por Lai, Chou, y Chao (2001). El porcentaje de atrapamiento de las muestras sobre el radical DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% SE = \left( 1 - \frac{Abs_{Muestra} 517 nm}{Abs_{Control} 517 nm} \right) * 100$$

Donde el %SE (scavenging effect) es el porcentaje de atrapamiento, Abs<sub>muestra</sub> corresponde a la absorbancia de la muestra a 517 nm y Abs<sub>control</sub> es la absorbancia inicial de la solución de DPPH.

Concentración eficiente EC<sub>50</sub> que se define como la cantidad total de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical DPPH en un 50%, se determinó a partir del gráfico de %SE vs la concentración de los extractos o de las sustancias de referencia.

- **Ensayo de potencial antioxidante de reducción del hierro FRAP:** El ensayo de FRAP se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento planteado por Benzie y Strain (1996). El cambio en la absorbancia ( $\Delta A_{593}$ ) entre la lectura final después

de los 4 min de reacción y la lectura inicial del reactivo se calculó y se relacionó con  $\Delta A_{593}$  de las soluciones estándar de  $\text{Fe}^{2+}$  analizadas simultáneamente. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{moles}$  equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$  /g de muestra en base seca.

- **Ensayo espectrofotométrico de antioxidantes totales sobre ABTS<sup>+</sup>**: El efecto antioxidante de los extractos de cacao y las sustancias patrón sobre el catión radical ABTS<sup>+</sup>, se cuantificó de acuerdo al método reportado por Re et al., 1999. Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox/kg de muestra en base seca a partir de la curva de calibración de Trolox realizada con concentraciones entre 0,25 y 2 mM.

### **2.3.5 Extracción y Cuantificación de (-)-Epicatequina y (±)-Catequina por HPLC.**

La extracción de la (-)-Epicatequina y (±)-Catequina a partir de los extractos polifenólicos se realizó de la siguiente forma: 5mL de extracto etanólico se concentraron en el evaporador rotatorio a 35°C hasta sequedad y posteriormente se disolvieron con agua destilada aforando a 5 mL. El extracto acuoso se sometió a dos extracciones líquido-líquido sucesivas con el fin de eliminar interferencias presentes en la muestra como cafeína y otros compuestos coloreados según el método de limpieza reportado por Row y Jin (2006); la primera extracción se realizó con 5 mL de cloroformo y la segunda con 5 mL de acetato de etilo conservando de la segunda extracción la fase orgánica, la cual fue llevada a sequedad con flujo de nitrógeno. La muestra seca se diluyó en 1 mL de agua HPLC y se purificó usando filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro para su posterior inyección en el cromatógrafo.

Los análisis para la cuantificación de (-)-Epicatequina y (±)-Catequina fueron realizados por el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander usando el método de estándar externo desarrollado por Cala y Vásquez (2008). Las condiciones del método cromatográfico fueron: fase móvil 18% metanol, 82% agua: ácido acético (100:0,1), temperatura 35°C, flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  y longitud de onda DAD de 210 nm. Para la cuantificación se usaron las curvas de calibración reportadas por las autoras del método (**ANEXO 2**).

**2.3.6 Análisis estadístico.** Todos los resultados obtenidos para las mediciones de polifenoles totales por F-C y de Actividad antioxidante se sometieron a un tratamiento estadístico en donde se les aplicó el test de normalidad de Kormogorof-Smirnov, seguido del análisis de varianza ANOVA, mediante el cual se determinó si existen deferencias significativas entre las variables evaluadas, finalmente se aplicó la prueba a posteriori de Tukey que permitió evaluar las diferencias significativas entre las medias. Las diferencias fueron consideradas a un nivel de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó usando el Software estadístico SPSS 10.0 para WINDOWS.

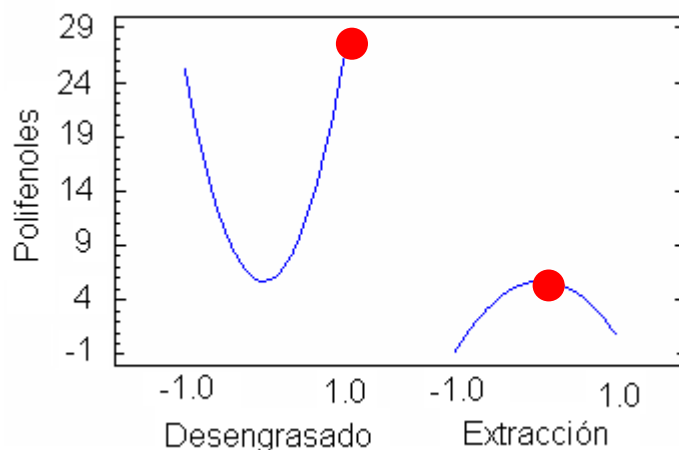
### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Previo a la determinación del contenido total de polifenoles y de la actividad antioxidante de las diferentes muestras de cacao, fue necesario optimizar el método de desengrasado y de extracción de los polifenoles. En la **Tabla 5**, se presentan los resultados obtenidos de la aplicación del diseño experimental aplicado para tal fin.

El análisis de efectos principales (**Gráfica 1**) muestra la influencia que tienen las variables en forma individual sobre la variable respuesta. Para la variable desengrasado el efecto máximo se obtiene con el nivel 1, correspondiente al método de desengrasado con hexano-ultrasonido, mientras que para la variable extracción el efecto máximo se obtiene con nivel 0, correspondiente al método de extracción Etanol-Agua (E/A).

**Gráfica 1.** Diagrama de efectos principales sobre la variable respuesta



**Tabla 5.** Resultados del diseño experimental

<b>Experimento</b>	<b>Desengrasado</b>	<b>Extracción</b>	<b>mg ÁG/g</b>
1	DEP	A/E	15,76
2	DSH	A/E	20,84
3	DEP	A/Agua/ÁA	0,63
4	DHU	A/Agua/ÁA	2,69
5	DSH	A/M	19,89
6	DHU	A/M	2,35
7	DEP	A/M	27,30
8	DSH	A/Agua/ÁA	21,78
9	DHU	A/E	27,28
10	DEP	A/E	13,49
11	DSH	A/E	20,94
12	DEP	A/Agua/ÁA	0,56
13	DHU	A/Agua/ÁA	3,13
14	DSH	A/M	20,88
15	DHU	A/M	2,69
16	DEP	A/M	29,61
17	DSH	A/Agua/ÁA	21,39
18	DHU	A/E	26,79
19	DEP	A/E	16,40
20	DSH	A/E	21,91
21	DEP	A/Agua/ÁA	0,48
22	DHU	A/Agua/ÁA	2,20
23	DSH	A/M	21,22
24	DHU	A/M	2,29
25	DEP	A/M	28,87
26	DSH	A/Agua/ÁA	21,98
27	DHU	A/E	28,02

El efecto de las variables y su interacción, se evaluó aplicando el análisis de varianza ANOVA, y se encontró que el valor **P** que determina si los valores

estimados para la varianza difieren significativamente, fue menor a 0,05 para los efectos cuadráticos de desengrasado y extracción, (D)(D) y (E)(E) respectivamente, lo que indica que estos factores afectan significativamente la variable respuesta dentro de un nivel de confianza del 95% (Ver **Tabla 6**).

**Tabla 6.** Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de polifenoles (mg ÁG/g)

<b>Variable</b>	<b>SCM</b>	<b>CME</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
D	19,17	19,17	3,13	0.09
E	12,27	12,27	2,00	0.17
DD	2538,87	2538,87	414,01	0
EE	201,14	201,14	32,80	0
DE	26,38	26,38	4,30	0,05
Bloques	1,46	0,73	0,12	0,89
Error total	<b>116,52</b>	<b>6,13</b>		

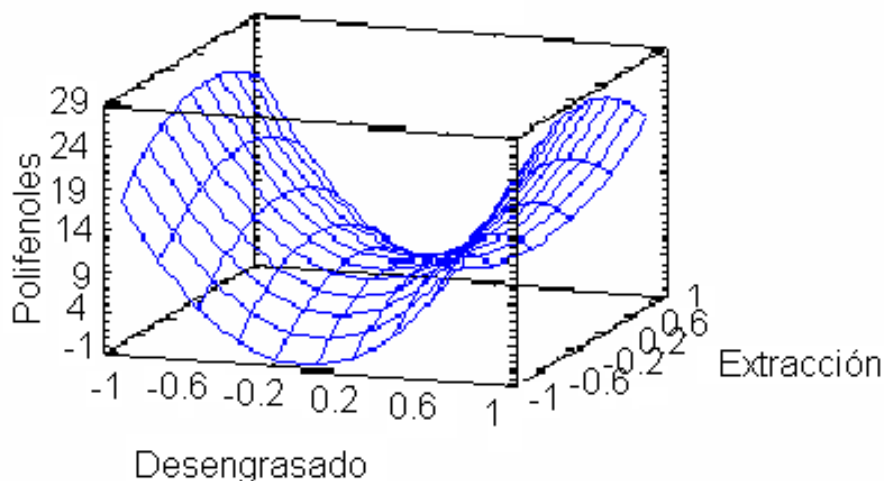
F: Prueba de significancia, P: prueba de error, SCM: Suma de cuadrado medio, CME: Suma de cuadrado medio del error total.

Se estableció además un modelo matemático para relacionar la variable respuesta con las dos variables independientes y determinar mediante el método de Gauss-Newton los coeficientes de regresión que se presentan en la **Tabla 7**, con los cuales se construyen los gráficos de superficie de respuesta (**Gráfica 2**). En este caso estas gráficas mostraron que valores más altos de polifenoles se logran con la interacción del método de desengrasado hexano-ultrasonido (DHU) y el método de extracción etanol-agua (E/A).

**Tabla 7.** Coeficientes de regresión del modelo polinomial

Términos		Coefficientes
Lineal	D: desengrasado	0,00206378
	E: extracción	0,001651
Cuadrático	D*D	0,041141
	E*E	-0,00296542
Interacciones	D*E	-0,01158

**Gráfica 2.** Superficie de respuesta obtenida para el contenido de polifenoles (mg ÁG/g)



### 3.2 EVALUACIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES

Previa a la determinación de polifenoles totales y de la actividad antioxidante las muestras fueron analizadas en cuanto a contenido de humedad y de grasa total (**Tabla 8**). Se observa que la humedad disminuye durante el tostado y la molienda de las semillas, debido a las altas temperaturas que se alcanzan en estas etapas. En los productos el contenido de humedad osciló entre 0,47 y 1,83%.

La grasa total durante el proceso varió entre 53,57 y 57,17%. Su incremento en la etapa de molido se da porque la molienda del cacao tostado facilita la liberación de la manteca de cacao contenida en las células de la semilla para dar paso a la formación de la pasta fluida conocida como licor de cacao. En los productos el contenido de grasa total es variable y depende de la proporción de licor de cacao utilizada en la formulación, que en el caso del chocolate de mesa es del 30%.

**Tabla 8.** Contenido de humedad, grasa total determinada por el método de Soxhlet y grasa extraída de las muestras por el método de ultrasonido y n-hexano

	Muestra	% Humedad	% Grasa Total extraída por Soxhlet	% Grasa extraída por DHU
<b>Proceso</b>	<b>MP</b>	4,44 ± 0,05	55,29 ± 0,08	36,32 ± 3,24
	<b>T</b>	2,0 ± 1,34	53,57 ± 0,24	31,80 ± 1,37
	<b>Mol</b>	1,82 ± 1,07	57,17 ± 0,62	55,44 ± 2,40
	<b>Mad</b>	1,83 ± 0,57	56,21 ± 0,84	55,24 ± 3,40
	<b>Mez</b>	0,47 ± 0,10	16,01 ± 0,24	16,02 ± 0,28
<b>Productos</b>	<b>Ch</b>	0,47 ± 0,10	16,01 ± 0,24	16,02 ± 0,28
	<b>ChA</b>	1,83 ± 0,57	56,21 ± 0,84	55,24 ± 3,40
	<b>C</b>	0,57 ± 0,07	15,85 ± 0,27	15,79 ± 0,48
	<b>P</b>	1,19 ± 0,09	16,29 ± 0,39	16,27 ± 0,08

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar de las mediciones.

Al comparar los valores obtenidos para la grasa total determinada por Soxhlet, con los alcanzados usando el método de desengrasado con hexano y ultrasonido (DHU), se observa que con este último método solo se logra extraer entre el 60% y 65% de la grasa total presente en las semillas sin tostar y las semillas tostadas, respectivamente. Este hecho se debe a que las condiciones de extracción por DHU

son suaves y no permiten la extracción total de la grasa retenida en las paredes celulares de las semillas.

En el caso del cacao molido y de los productos, el porcentaje de grasa extraída por los dos métodos es similar, lo que demuestra que el proceso de molienda facilita la liberación y la extracción de la grasa.

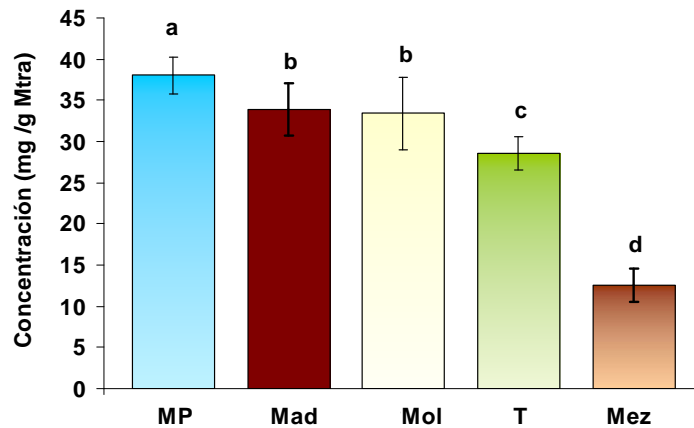
En cuanto a la evolución del contenido de polifenoles totales durante el proceso de manufactura se halla que la materia prima que entra al proceso (semillas secas y fermentadas) presenta el mayor contenido de PT (39 mg ÁG/g) pero una vez es tostada, la cantidad de polifenoles disminuye (29 mg ÁG/g) en una proporción equivalente a 23%.

En las etapas de molienda y maduración, la cantidad de polifenoles alcanza un valor de 34 mg ÁG/g, valor que nuevamente disminuye durante el mezclado por el efecto de dilución que se da al adicionar al licor de cacao ingredientes como azúcar y lecitina. Otras etapas como el atemperado y el moldeo no tienen efecto sobre el contenido total de polifenoles, como puede observarse en la **Gráfica 3**.

Wallgast et al., (2004) encontraron resultados similares al seguir la línea de procesamiento del licor de cacao, es decir el contenido de polifenoles después del tostado fue inferior al contenido de polifenoles del cacao molido. Los investigadores atribuyeron esta tendencia a la posible formación de otros compuestos en la reacción de Maillard y a la formación de nuevos compuestos polifenólicos provenientes de reacciones de epimerización y condensación, los cuales pueden presentar respuesta positiva al reactivo de Folin-Ciocalteu.

La pérdida de polifenoles durante el tostado puede atribuirse al efecto de la temperatura. Arlorio, et al., (2007) encontraron que el contenido de polifenoles para semillas de diferentes países de origen, disminuye durante los procesos de pretostado (100 °C) y tostado (130 °C) en un rango de 32,6% a 54,7% respectivamente, para resultados expresados como equivalentes de (±)-Catequina.

**Gráfica 3.** Variación del contenido de polifenoles totales en el proceso de elaboración de chocolate de mesa



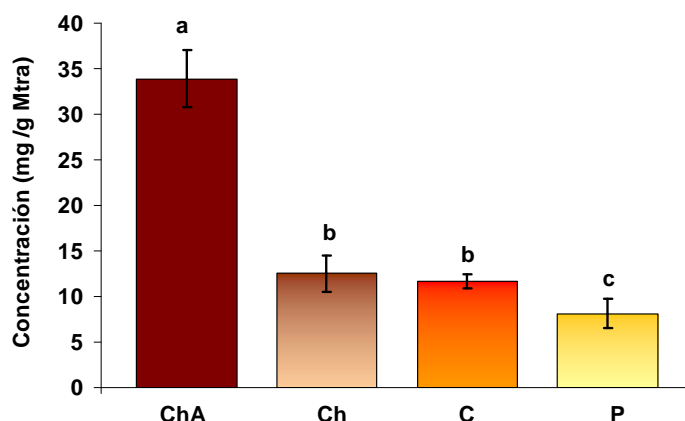
Todos los resultados se expresan como la media desviación estándar para n=12 y para MP n=20. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza  $P < 0,05$ .

En el estudio realizado por Jonfia-Eisen et al., (2008) con semillas de diferentes variedades clonales de cacao, los autores reportaron contenidos de polifenoles totales de 70-80 mg ÁG/g, superiores a los encontrados en este estudio.

En los productos, el contenido de polifenoles totales muestra diferencias significativas entre ellos, clasificándolos en tres grupos (**Gráfica 4**): grupo **a** con alto contenido de polifenoles en el cual se ubica el chocolate amargo, grupo **b** con un contenido intermedio en el cual se encuentra el chocolate tradicional y el chocolate clavos y canela y el grupo **c**, con contenido minoritario, donde se encuentra el chocolate fabricado con cocoa y aceite vegetal.

El chocolate amargo tiene una concentración de polifenoles 3 veces superior a la determinada en el chocolate tradicional y en el chocolate clavos y canela debido al efecto de dilución que se da al adicionar a estos dos productos otros ingredientes. Estos últimos no mostraron diferencias significativas entre sí, a pesar de que el ingrediente que da el aroma a clavos y canela contiene polifenoles.

**Gráfica 4.** Contenido de Polifenoles Totales de los diferentes chocolates de mesa



Todos los resultados se expresan como la media desviación estándar para n=12 y para MP n=20. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza  $P < 0,05$ .

El producto elaborado con cocoa en polvo y grasa vegetal presentó el menor contenido de polifenoles totales (4 veces menos que el chocolate de mesa amargo).

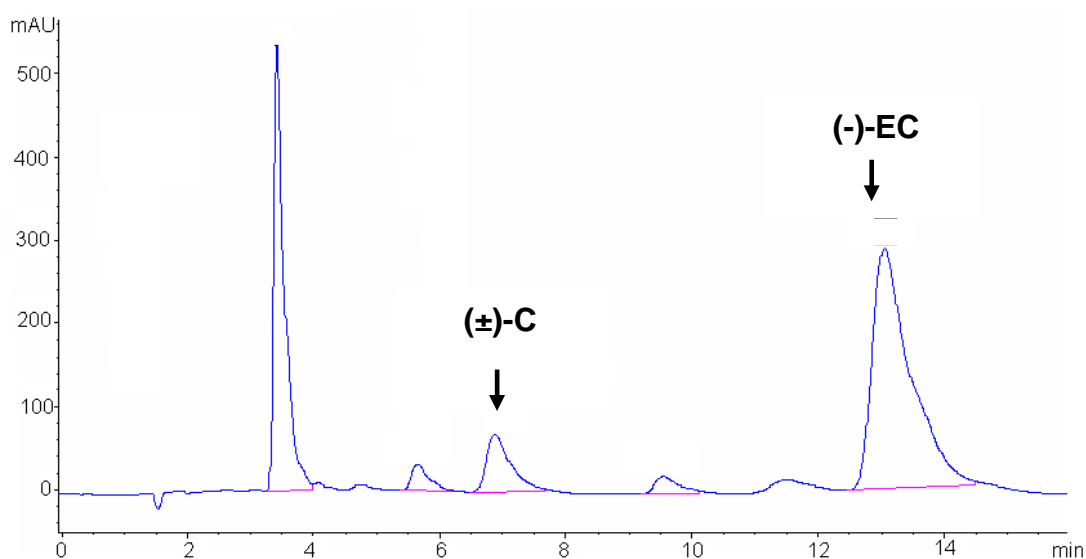
Los valores obtenidos para el chocolate amargo fueron superiores a los reportados por Miller (2006) para diferentes chocolates negros (12,30-14,88 mg ÁG/g), similares a los reportados por Vinson et al., (1999) (36,5 mg/g), pero inferiores a los obtenidos por Luna (2002) en licores de cacao ecuatorianos. En este último caso sin embargo, el contenido total de polifenoles se expresó como equivalentes de (-)-Epicatequina (53,90-66,50 mg/g).

### 3.3 EVALUACIÓN DE (-)-EPICATEQUINA Y ( $\pm$ )-CATEQUINA

En esta sección se presentan los resultados de la cuantificación del contenido de los flavonoides (-)-Epicatequina y ( $\pm$ )-Catequina en las semillas y en cada uno de los productos finales. Cabe aclarar que en este punto no se evaluó la variación de estos flavonoides durante el proceso, debido al alto costo de los análisis.

En la **Figura 6** se presenta el perfil cromatográfico típico de los extractos de cacao, donde se indican las señales correspondientes a los flavonoides (-)-Epicatequina y (±)-Catequina. Los cromatogramas obtenidos para cada tipo de extracto se presentan en el **ANEXO 3**.

**Figura 6.** Perfil cromatográfico de un extracto de semilla seca y fermentada



En la **Tabla 9** se relacionan los resultados de la cuantificación de estos polifenoles y se observa que el contenido de (±)-Catequina en todas las muestras es inferior al contenido de (-)-Epicatequina. Comparando además el contenido de estos compuestos en el licor de cacao, se encuentra que la (-)-Epicatequina disminuye en un factor de 2,1 respecto a las semillas en tanto que el contenido de (±)-Catequina se incrementa en un factor de 2,4. Lo anterior puede deberse a la isomerización (**Figura 7**) que sufre la (-)-Epicatequina durante el tostado por acción de las altas temperaturas aplicadas (Wang y Helliwell, 2000). Estos resultados concuerdan con los reportados por Caligiani et al., (2007) y Wallgast (2004) quienes evaluaron la variación de la (-)-Epicatequina y la (±)-Catequina durante el procesamiento del chocolate negro (o chocolate amargo).

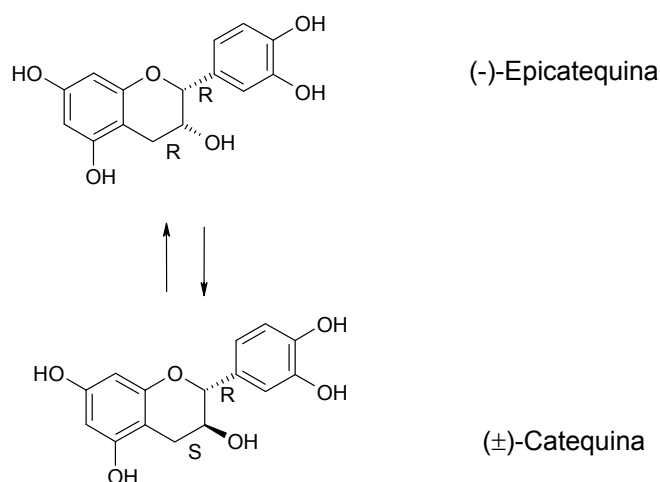
**Tabla 9.** Contenido de (-)-Epicatequina, (±)-Catequina y suma de los dos flavonoides en las muestras expresados como mg/g de muestra

Muestra	(±)- Catequina	(-)- Epicatequina	Suma (-)-EC + (±)-C	Polifenoles totales*
<b>MP</b>	0,13±0.01	4,34±0.71	4,48±0.72	38,01
<b>ChA</b>	0,31±0.01	2,07±0.06	2,38±0.06	33,89
<b>Ch</b>	0,08±0.03	0,44±0.22	0,52±0.25	12,56
<b>C</b>	0,08±0.07	0,32±0.20	0,40±0.27	11,70
<b>P</b>	0,13±0.06	0,38±0.15	0,51±0.21	8,11

Todos los resultados se expresan como la media ± desviación estándar para n= 4 y n = 7 para MP. Los valores corresponden a mg/g de muestra en base seca.

\*Los polifenoles totales corresponden a la cuantificación realizada por el método de Folin-Ciocalteu.

**Figura 7.** Equilibrio térmico de (±)-Catequina y (-)-Epicatequina



Sumando los contenidos (-)-Epicatequina y (±)-Catequina para los diferentes productos (0,51 – 4,48 mg/g), se comprueba que el chocolate amargo tiene once (11) veces más flavonoides que los demás productos. Además estos valores fueron superiores a los encontrados por Gu et al., (2006) quienes reportaron entre 1,47 y 2,53 mg/g para la suma de (-)-Epicatequina más (±)-Catequina en chocolate amargo;

a los de Arts et al., (1999) que obtuvieron 0,5 mg/g en extractos metanólicos de chocolate negro, y a los de Vinson et al., (1999) que mostraron valores entre 0,48-1,37 mg/g para el mismo tipo de extracto.

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de las muestras, se midió sobre diferentes radicales como el DPPH, el ABTS<sup>+</sup> y la habilidad reductora por el método de FRAP.

Todos los datos obtenidos en la determinación de AOC, presentaron un comportamiento normal después de aplicarse la prueba de Kormogorof- Smirnov con un nivel de confianza de 95% ( $p < 0.05$ ), por lo tanto fue posible la aplicación de pruebas paramétricas como el análisis de varianza ANOVA y la prueba a posteriori de TUKEY para el análisis de los resultados.

El análisis de varianza ANOVA mostró diferencias significativas en todos los casos por lo cual fue posible la aplicación de la prueba de TUKEY.

**3.4.1 Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).** Para llevar a cabo la cuantificación de la actividad antioxidante por este método, se elaboró una curva de calibración con soluciones etanólicas del radical DPPH a diferentes concentraciones para determinar la concentración inicial del radical DPPH a una absorbancia de  $0,7 \pm 0,02$  (765 nm) (Ver **ANEXO 4**).

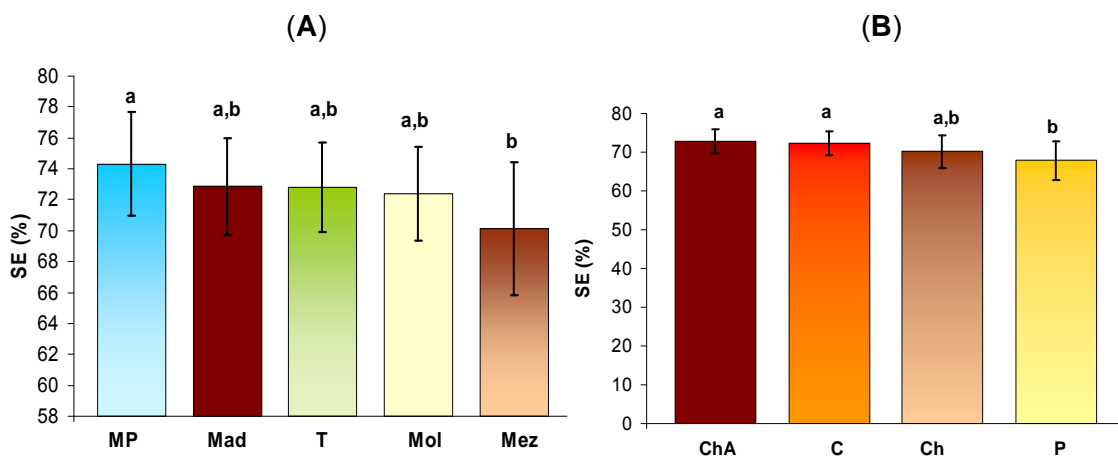
En las **Gráficas 5A y 5B** se representan los resultados de la medición de la actividad antioxidante (%SE) sobre el radical DPPH, para las muestras obtenidas en las diferentes etapas del proceso y los diferentes productos.

Para el proceso se alcanzan porcentajes (%) de decoloración que oscilan entre 70 y 75% y al aplicar la prueba de Tukey se obtienen tres grupos diferenciables : grupo

(a) en el cual se encuentran las semillas, con un contenido máximo de actividad antioxidante; grupo (ab) en la cual se ubican las muestras de cacao tostado, molido y madurado, que no presentan diferencias significativas entre ellas y que tienen una actividad antioxidante intermedia y el grupo (b) correspondiente a la etapa de mezclado, con la actividad antioxidante más baja.

Para los productos, el porcentaje (%) de decoloración osciló entre 67,9 y 72,9% y la prueba de Tukey clasificó los productos también en tres grupos como se observa en la Gráfica 5B, a pesar de que tienen diferentes contenidos de polifenoles totales.

**Gráfica 5.** Variación de la actividad antioxidante sobre el radical (DPPH) de: (A) En la línea del proceso para la elaboración de chocolate y (B) Productos finales



Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para n=12 y para MP n=20. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza P<0,05.

En las gráficas 6A y 6B se presenta la variación de %SE con la concentración de los antioxidantes de referencia (TROLOX, Ácido ascórbico y Ácido Gálico) y de los extractos etanólicos de los productos analizados. A partir de estas curvas se determinaron los valores de EC<sub>50</sub> que se presentan en la **Tabla 10** observándose que todos los productos tienen un comportamiento cinético similar, presentando un rápido incremento en la actividad antioxidante a concentraciones de 0,5 a 2,5

mg/mL, seguida de un comportamiento constante en el %SE para concentraciones superiores.

**Tabla 10.** Concentración efectiva media EC<sub>50</sub> sobre el radical DPPH

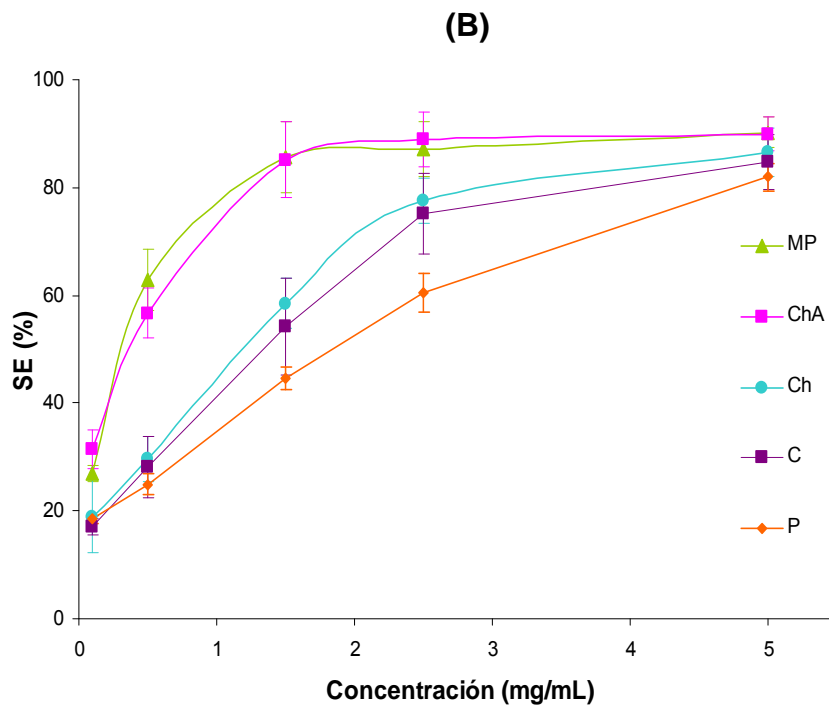
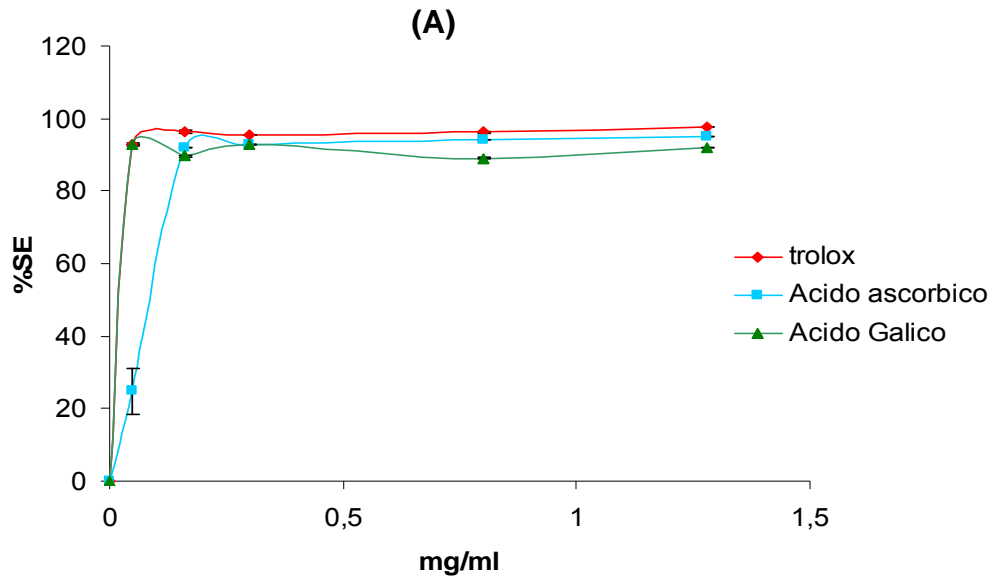
<b>Muestras</b>	<b>EC<sub>50</sub> DPPH (mg/mL)</b>
MP	0,38 ± 0,04
Ch	1,20 ± 0,17
ChA	0,40 ± 0,06
C	1,27 ± 0,20
P	1,85 ± 0,19
Ácido Gálico	0,027± 0,00
Ácido Ascórbico	0,07± 0,02
TROLOX	0,03± 0,00

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n= 6) y n=2 para las sustancias de referencia.

Con base en estos resultados, se puede determinar que en todos los extractos de cacao, la concentración efectiva media es superior a la de las sustancias de referencia lo que indica una menor actividad antioxidante sobre el radical DPPH. El ácido ascórbico comercial por ejemplo, tiene una actividad antioxidante diecisiete veces superior a la del chocolate amargo.

En el caso del chocolate amargo, los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos muestran que la concentración de extracto de este producto necesaria para inhibir en un 50% la actividad del radical DPPH es 3 veces menor que la requerida con los demás tipos de chocolates de mesa, lo cual se traduce en una mayor actividad antioxidante. Similar comportamiento se observó para las semillas de cacao sin tostar.

**Gráfica 6.** Actividad antioxidante de las sustancias de referencia sobre el radical DPPH **(A)**. Actividad antioxidante sobre el radical DPPH en cuatro tipo de chocolate de mesa **(B)**.

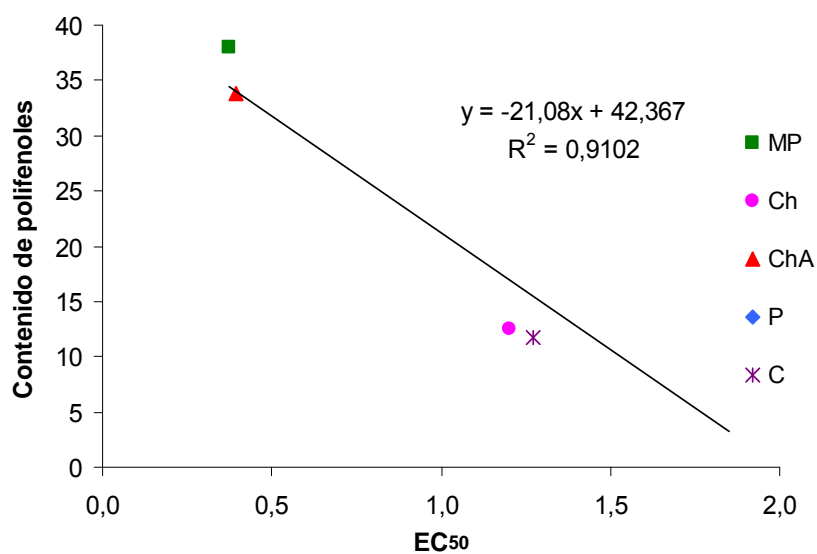


Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para  $n = 2$  en el caso de la gráfica (A) y para  $n = 6$  en la gráfica (B).

Otham et al., (2005) y Arlorio et al., (2007) hallaron en su estudio con semillas de cacao secas y fermentadas valores de EC<sub>50</sub> de 0,30 y 0,15 mg/mL, similares a los encontrados en esta investigación. No hay reportes para productos terminados.

Finalmente relacionando el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante medida por el método DPPH, se encuentra que no existe una correlación directa entre las dos variables, debido probablemente a la baja sensibilidad que presenta el método frente a concentraciones altas de los extractos. En cuanto a los valores de EC<sub>50</sub>, se encuentra que aunque estos se relacionan directamente con el contenido de polifenoles, su coeficiente de correlación lineal es bajo R<sup>2</sup>= 0.91 tal como se muestra en la **Gráfica 7**.

**Gráfica 7.** Relación entre el contenido de polifenoles totales (mg ÁG/g) y la actividad antioxidante (EC<sub>50</sub>) (mg/mL) de los extractos de cacao

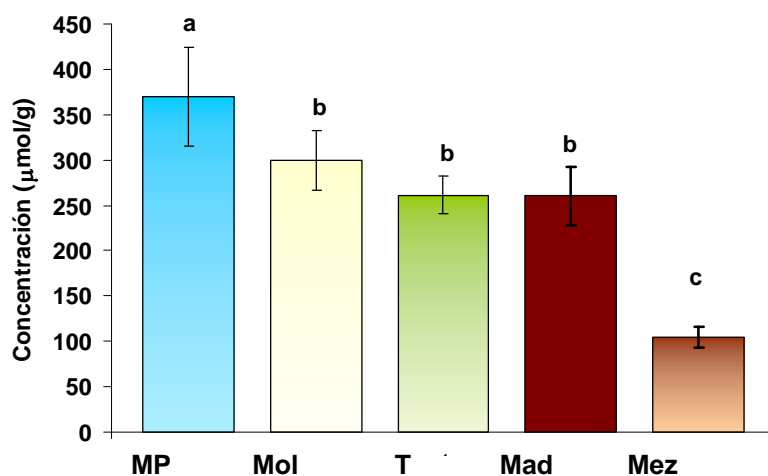


**3.4.2 Ensayo de potencial de reducción del hierro FRAP.** Mediante este ensayo se evaluó la habilidad reductora de los extractos de cacao sobre el complejo de

hierro (III). Todos los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol Fe (II)/g}$ . En el **ANEXO 5**, se presenta la curva de calibración utilizada.

En la **Gráfica 8** se presentan los resultados de la medida del potencial de reducción en las diferentes etapas de proceso, lo cual permitió clasificarlos después de aplicar el tratamiento estadístico, en tres grupos: el grupo (a) con la materia prima con mayor actividad antioxidante ( $355 \mu\text{mol Fe (II)/g}$ ), grupo (b) de actividad antioxidante intermedia con las muestras obtenidas después del tostado, la molienda y la maduración entre las cuales no se encontraron diferencias significativas y el grupo (c) con la actividad antioxidante más baja en el cual se ubica la muestra obtenida en la etapa de mezclado.

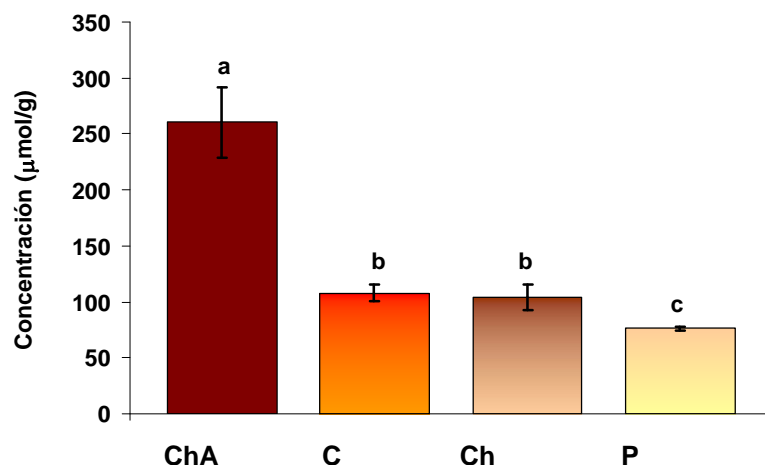
**Gráfica 8.** Potencial de reducción del Hierro (FRAP) de las muestras de la línea de producción del chocolate de mesa



Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para  $n=12$  y para MP  $n=20$ . Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza  $P<0,05$ .

Para los productos (**Gráfica 9**) se encontró que el chocolate amargo presenta el mayor valor, seguido de los chocolates tradicional y clavos y canela los cuales no muestran diferencias significativas entre si y finalmente el chocolate a partir de polvo de cacao que presenta la menor actividad antioxidante ( $100 \mu\text{mol Fe (II)/g}$ ).

**Gráfica 9.** Potencial de reducción del Hierro (FRAP) en cuatro variedades de chocolate de mesa

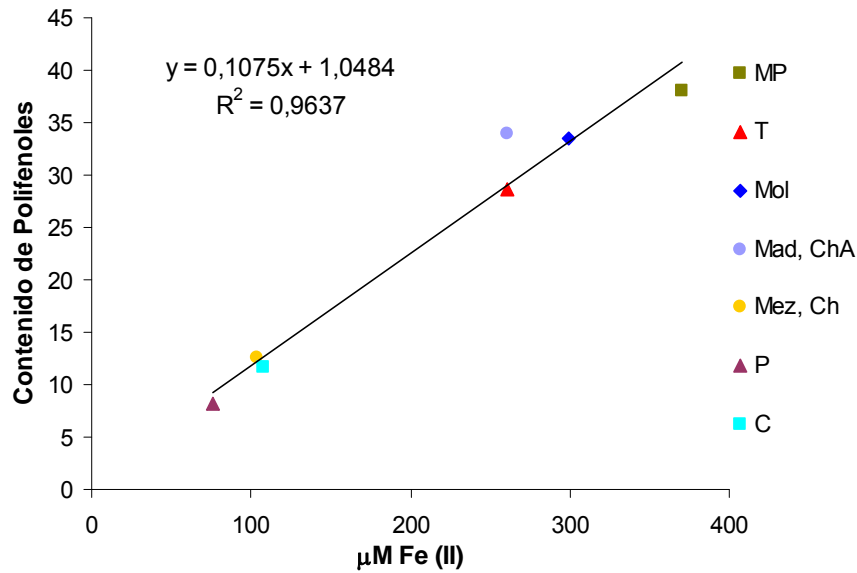


Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para  $n=12$  y para MP  $n=20$ . Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza  $P<0,05$ .

En este caso a actividad antioxidante sí tiene una correlación positiva con el contenido de polifenoles ( $R^2= 0,96$ ), como se muestra en la **Gráfica 10**.

Adicionalmente se calcularon los equivalentes de Fe (II) para las sustancias de referencia (**Tabla 11**) y se compararon con los obtenidos para las muestras de cacao, encontrándose que las sustancias de referencia poseen una actividad antioxidante muy superior a la de las semillas secas y fermentadas (MP) y a la del chocolate amargo (ChA) que presentaron valores de  $369,96 \pm 54,25$  y  $260,29 \pm 11,33$  respectivamente.

**Gráfica 10.** Correlación lineal entre el contenido de polifenoles totales y el potencial de reducción del hierro (FRAP)



Los polifenoles totales se expresan como mg ÁG/g y el potencial de reducción del hierro se expresa como µmol Fe (II)/g.

**Tabla 11.** Reducción del hierro expresada como µmol Fe (II)/g para sustancias de referencia

Sustancia de referencia	µmol Fe(II)/g
TROLOX	8521,56 ± 556,39
Ácido gálico	16153,37 ± 110,69
Ácido ascórbico	8300,19 ± 258,23

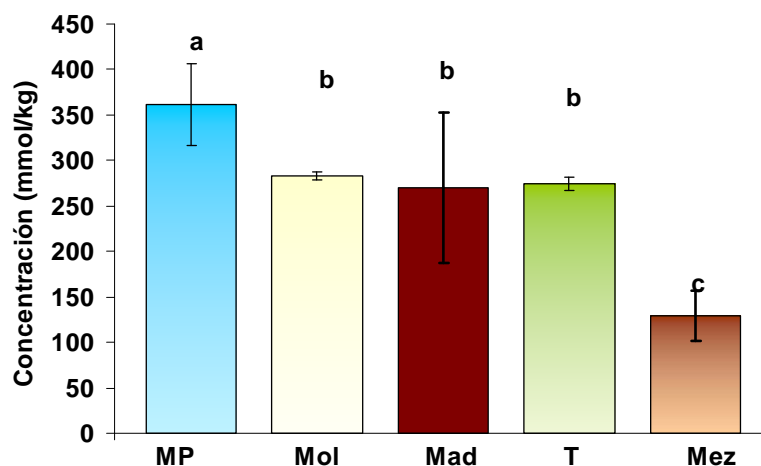
Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n=3)

**3.4.3 Antioxidantes totales sobre el radical ABTS<sup>+</sup>.** Mediante este ensayo se estudio la habilidad de las muestras de cacao para eliminar el catión radical ABTS<sup>+</sup>.

presente en el medio de reacción, en el **ANEXO 6** se presenta la curva de calibración utilizada).

Se encontró que el tostado, la molienda y la maduración afectan la actividad antioxidante inicial de la materia prima, reduciéndola en un 24%, para finalmente alcanzar una actividad antioxidante de 129.70 mmol Trolox/g en el proceso de mezclado de donde se obtiene el chocolate que sale al mercado (ver **Gráfica 12**).

**Gráfica 12.** Variación de los antioxidantes totales sobre el radical ABTS<sup>+</sup> en la línea de producción del chocolate de mesa

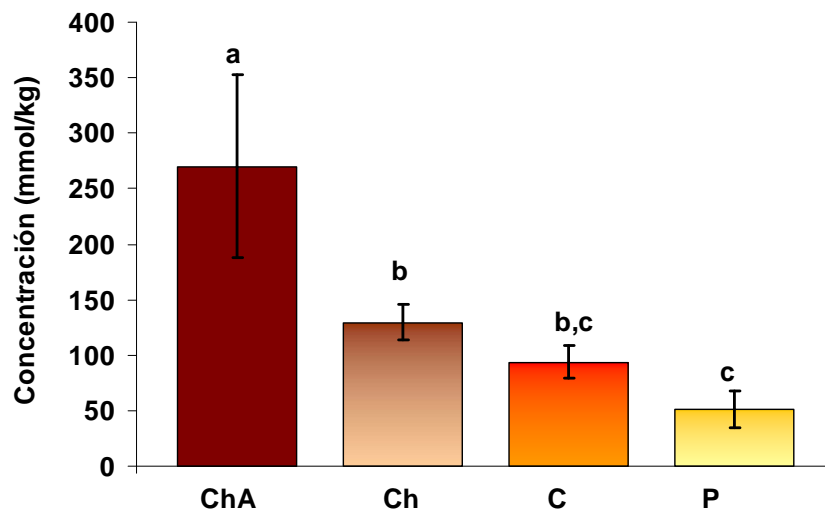


Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para n=12 y para MP n=20. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza  $P < 0,05$ .

Con respecto a los productos se destaca nuevamente el chocolate amargo con una actividad de 270.11 mmol Trolox/g. Los demás chocolates presentaron valores inferiores que oscilan entre 129,7 y 51,42 mmol Trolox/g, siendo el chocolate a partir de polvo de cacao y aceite vegetal el que presenta la menor eliminación del radical ABTS<sup>+</sup>.

En la **Tabla 12** se reportan los valores de la actividad antioxidante expresadas como mmol TROLOX/kg para las sustancias de referencia; estos valores muestran ser superiores en todos los casos a los de las muestras de cacao analizadas (361 a 51mmol TROLOX/kg).

**Gráfica 13.** Antioxidantes totales sobre el ABTS<sup>+</sup> en cuatro variedades de chocolate de mesa



Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para n=12 y para MP n=20. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza P<0,05.

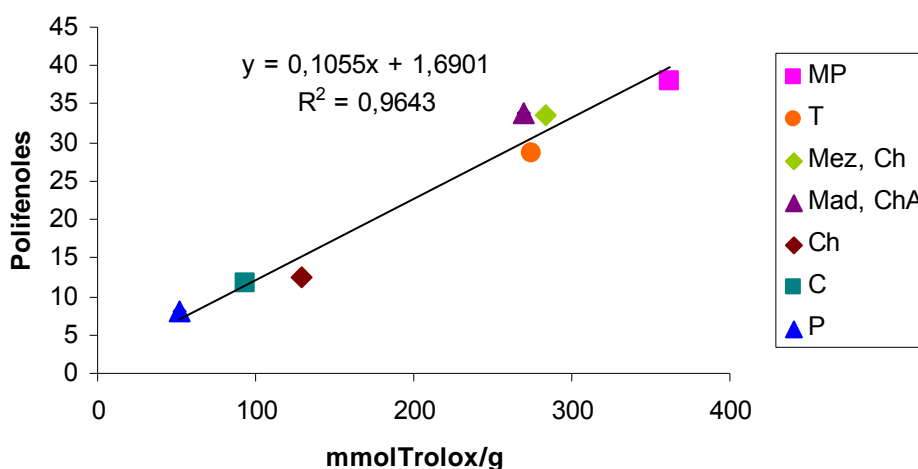
**Tabla 12.** Antioxidantes totales sobre el radical ABTS<sup>+</sup> para sustancias de referencia

Sustancia de referencia	mmol TROLOX/kg
Ácido gálico	3258,71 $\pm$ 7,3
Ácido ascórbico	6185,37 $\pm$ 15,2

Los valores son expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

Al comparar los antioxidantes totales sobre el ABTS<sup>+</sup> con el contenido de polifenoles totales de las muestras, se encontró que hay una correlación lineal con R<sup>2</sup>= 0,97 (**Gráfica 14**), lo que indica que los polifenoles presentes en las muestras son los responsables de la eliminación del radical ABTS<sup>+</sup>.

**Gráfica 14.** Correlación lineal entre el contenido de polifenoles y los antioxidantes totales sobre el ABTS<sup>+</sup>.



Los polifenoles totales se expresan como mg ÁG/g y los mmol Trolox/g corresponden a los antioxidantes totales sobre el ABTS<sup>+</sup>.

En la **Tabla 13**, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en esta investigación, relacionado el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante medida por diferentes métodos. De ello es posible concluir que el proceso de manufactura del chocolate de mesa afecta el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante presente inicialmente en las semillas de cacao secas y fermentadas siendo la etapa de mayor incidencia el tostado debido a las altas temperaturas utilizadas.

El producto con mayor actividad antioxidante es el chocolate amargo; la baja concentración de licor de cacao en los demás chocolates tiene una influencia muy importante en la baja actividad antioxidante presentada por estos productos.

**Tabla 13.** Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante medida por los métodos DPPH, FRAP y ABTS de todas las muestras evaluadas.

Muestra	Polifenoles		AA por el	AA por el	AA por el método
	totales medidos por el método F- C (mg ÁG/g)	AA por el método DPPH (%SE)	método FRAP( $\mu$ mol Fe(II)/g)	método FRAP( $\mu$ mol Fe(II)/g)	ABTS <sup>+</sup> (mmol TROLOX/kg)
<b>Proceso</b>	<b>MP</b>	38,01 $\pm$ 2,27	73,77 $\pm$ 2,89	369,96 $\pm$ 54,25	361,45 $\pm$ 44,68
	<b>T</b>	28,60 $\pm$ 6,66	72,80 $\pm$ 2,89	261,15 $\pm$ 55,17	274,40 $\pm$ 37,61
	<b>Mol</b>	33,44 $\pm$ 4,38	72,41 $\pm$ 3,03	299,69 $\pm$ 33,25	283,51 $\pm$ 42,64
	<b>Mad</b>	33,98 $\pm$ 3,13	72,86 $\pm$ 2,06	260,29 $\pm$ 31,79	270,11 $\pm$ 82,40
	<b>Mez</b>	12,56 $\pm$ 1,99	70,16 $\pm$ 4,30	104,05 $\pm$ 11,33	129,70 $\pm$ 27,78
<b>Productos</b>	<b>ChA</b>	33,98 $\pm$ 3,13	72,86 $\pm$ 2,06	260,29 $\pm$ 31,79	270,11 $\pm$ 82,40
	<b>Ch</b>	12,56 $\pm$ 1,99	70,16 $\pm$ 4,30	104,05 $\pm$ 11,33	129,70 $\pm$ 27,78
	<b>C</b>	11,70 $\pm$ 0,75	72,25 $\pm$ 3,10	107,96 $\pm$ 7,30	93,41 $\pm$ 14,81
	<b>P</b>	8,11 $\pm$ 1,59	67,86 $\pm$ 5,02	76,15 $\pm$ ,159	51,42 $\pm$ 16,57

Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar para n=12 y para MP n=20.

El contenido de polifenoles totales de los extractos etanólicos de cacao es comparable con el obtenido en té verde para el cual Moraes-De-Souza et al., (2008) reportan 46,46 mg ÁG/g; pero es muy superior al determinado por Imeh y Khokhar (2002) en frutas como la manzana (3,6-5,3 mg AG/g), la pera (3,3-4,6 mg AG/g) y el Kiwi (3,0 mg AG/g). No obstante, comparado con el vino tinto para el cual Avalos et al., (2008) obtienen entre 85 a 160 mg ÁG/g, el chocolate amargo contiene entre 2 y 4 veces menor contenido de polifenoles.

De lo anterior se puede establecer que comparado con los alimentos mencionados, el orden de clasificación en cuanto a contenido de polifenoles totales es: vino tinto > cacao = té verde > manzana > pera > kiwi, pudiendo entonces considerarse el cacao una buena fuente de antioxidantes.

La actividad antioxidante de las muestras analizadas en este trabajo (369,76-76,15  $\mu\text{mFe/g}$ ) también mostró ser superior a la reportada por Imeh y Khokhar (2002) para las frutas mencionadas anteriormente (18,1-10,6  $\mu\text{mFe/g}$  para manzana, 11,6-10,4  $\mu\text{mFe/g}$  para pera y 9,3  $\mu\text{mFe/g}$  para Kiwi). Lo anterior ratifica el alto valor nutricional del cacao y los efectos benéficos que su consumo puede traer a la salud.

## CONCLUSIONES

- El proceso de manufactura del chocolate de mesa, especialmente la etapa de tostado donde se emplean altas temperaturas, afecta el contenido de polifenoles totales presentes en las semillas de cacao (MP) disminuyéndolo.
- De los flavonoides evaluados en este trabajo, la (-)- Epicatequina es el que se encuentra en mayor proporción tanto en las semillas de cacao como en los diferentes chocolates de mesa; sin embargo este flavonoide se ve afectado por el proceso de manufactura al que son sometidas las semillas.
- La actividad antioxidante medida por diferentes ensayos (DPPH, FRAP y ABTS<sup>+</sup>) fue siempre mayor en las semillas secas y fermentadas (MP) y en el chocolate amargo (ChA).
- De los cuatro productos analizados el chocolate amargo (ChA) presentó el mayor contenido de polifenoles totales y la mayor actividad antioxidante sobre los radicales (DPPH y ABTS<sup>+</sup>) y el mayor potencial de reducción del hierro (FRAP), mientras que el chocolate a partir de polvo de cacao y aceite vegetal mostró en todos los casos los valores más bajos.
- La actividad antioxidante de los extractos etanólicos de cacao medida por los métodos de FRAP, ABTS<sup>+</sup> presento en todos los casos una correlación positiva con el contenido de polifenoles totales.
- El ensayo de actividad antioxidante sobre radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), mostró ser un método poco sensible a la variación de la actividad antioxidante durante las etapas de manufactura y en los diferentes productos,

contrario a lo que se observó en los resultados encontrados por los métodos de FRAP y ABTS, donde se presentaron diferencias significativas más relevantes.

## RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes condiciones de tostado teniendo en cuenta que durante esta etapa se presentó la mayor disminución de los polifenoles totales y la actividad antioxidante.
- Realizar un estudio que determine el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante en otros productos del mercado a base de chocolate.
- Promover la distribución en el mercado de productos con alto contenido de cacao los cuales proporcionen beneficios veraces a la salud de los consumidores.

## BIBLIOGRAFÍA

ABDUL O.; IBRAHIM, N. y ALIMON, H. Comparative studies on fermentation products of cocoa beans. **En:** World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 9 (1993); p. 381-382.

ADAMSON, G. HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. **En:** Journal Agricultural Food Chemistry. Vol.47 (1999); p. 4184-4188.

AMES, B.N., M.K. SHIGENAGA y HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **En:** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 90 (1993); p. 7915–7922.

AMIN, I.; FAIZUL, H. y AZLI, R. Effect of cocoa powder extract on plasma glucose levels in hyperglycaemic rats. **En:** Nutrition and Food Science. Vol. 34 (2004); p. 116–121.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; PATSALIDES, E.; MCDONALD S. y ROBARDS K. Methods for testing antioxidant activity. **En:** Analyst. Vol. 127 (2002); p. 183–198.

APAK, R.; GUCÜLU, K. G.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **En:** Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 52 (2004); p. 7970-7981.

ARTS I.C.W.; HOLLMAN P.C.H y KROMHOUT D. Chocolate as a source of tea flavonoids. **En:**The Lancet (1999); p. 354, 488.

AVALOS, K.; SGROPPO, S.; Y AVANZA, J. Actividad antioxidante y contenido en fenoles totales en vinos de origen nacional. **En:** FACENA. Vol. 19 (2003); p. 11-19.

BAYAR, V.; CHAMORRO F.; MOTTA, J.; HOLLENBERG, N. Does Flavanol Intake Influence Mortality from Nitric Oxide-Dependent Processes? Ischemic Heart Disease, Stroke, Diabetes Mellitus, and Cancer in Panama. **En:** International Journal of Medical Sciences. Vol. 4 (2007); p. 53-58.

BENZIE, I y STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. **En:** Analytical Biochemistry. Vol. 239(1996); p. 70-76.

BOLAÑOS, R. y PEÑARANDA, L.F. Diseño de un reactor para la fermentación del cacao y estudio de las variables que influyen en el proceso. Bucaramanga, 1990, Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencia Fisicoquímica. Departamento de Ingeniería Química.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **En:** Lebensm. Wiss. Technol. Vol. 28 (1995); p. 25-30.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary, sources, metabolism, and nutrition significance. **En:** Nutrition. N° 56 (1998); p. 317-333.

BUHELLI, P ; LUNA, F, CROUZILLAT, D; CIROU, L. Chemical Composition and Flavor of Ecuadorian Cocoa Liquor. **En:** Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 50 (2002); p. 3527-3532.

CALIGIANI, A; CIRLINI, M ; PALLA, M; RAVAGLIA, R y Arlorio ,M. GC-MS Detection of Chiral Markers in Cocoa Beans of Different Quality and Geographic Origin. **En:** Chilarity. Vol 19 (2007); p. 329-334

CAMARGO, J. Estudio del mercado mundial del cacao. **En:** J.E. Austin Associates Arlington, Virginia, Corporación CEA. Bogotá D.C., enero (2002).

CANO, A.; ALCARAZ, O.; ACOSTA, M.; ARNAO, M. B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS<sup>+</sup> assay. **En:** Redox Report. Vol. 7 (2002); p. 103-109.

COUNET, C. Chocolate and cocoa: New sources of trans -resveratrol and trans piceid. **En:** Food Chemistry, Vol. 98 (2006); p. 649–657.

CROFT, K. D.; BEILIN, L. J. y PUDDEY, I. B. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. **En:** American Journal Clinical Nutrition. Vol. 71 (2000); p. 67–74.

DANA - FARBER/HARVARD CANDER CENTER.  
<http://www.dfhcc.harvard.edu/membership/member-profile/member/586/0/> acceso 18 de marzo 2007.

DNP - Departamento Nacional de Planeación. Azúcar, confitería y chocolatería. Estudio sobre cadenas productivas: Estructura, comercio internacional y protección. Bogotá D.C (2004).

DONOVAN, J. L.; BELL, J. R.; KASIM-KARAKAS, S.; GERMAN, J. B.; WALZEM RL; HANSEN, R. J. y WATERHOUSE, A. L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. **En:** Journal Nutrition. Vol. 129 (1999); p. 1662–1668.

EISERICH JP, VAN DER VLIET A, HANDELMAN GJ y HALLIWELL B. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. **En:** American Journal Clinical Nutrition. Vol. 62 (1995); p. 1490S- 1500S.

Estadísticas de cadena. Cacao. <http://www.agrocadenas.gov.co/>. Acceso, Abril 12 de 2007.

Federación nacional del cacao. Ministro de agricultura y desarrollo rural. <http://www.fedecacao.com.co>. Acceso, Abril 12 de 2007.

GEUS, E. Compuesto polifenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. **En:** OFFARM Nutrición, Ámbito farmacéutico. Vol. 23, Núm. 6 (2004); p. 80- 84.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; MAIANI, G.; AZZINI, E.; FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. **En:** Free Radical Biology Medicine. Vol. 8 (1995); p. 29-36.

GLAZER, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. **En:** Methods Enzymol. Vol. 186 (1990); p.161-168.

GU L.; SUZANNE E.; HOUSE, X. OU B. y PRIOR R.. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. **En:** Journal Agricultural Food Chemistry. Vol. 54 (2006); p. 406-409.

HANSEN C.E.; DEL OLMO, M. y SCHMITZ H.H. Enzyme activities in coca beans during fermentation. **En:** Journal of the science of food and agriculture. Vol. 77 (1998); p. 237-281.

HERRMANN, K. Neuere Erkenntnisse ueber Kakaoehaltsstoffe. II. Catechine und Procyanidine und deren oxidative Kondensation sowie Ballaststoffe der Kakaoschalen. **En:** Gordan. Vol. 9 (1995); p. 141-142.

HOLLENBERG, N., BAYAR, V.; CHAMORRO F.; MOTTA, J. Does Flavanol Intake Influence Mortality from Nitric Oxide-Dependent Processes? Ischemic Heart Disease, Stroke, Diabetes Mellitus, and Cancer in Panama. **En:** International Journal of Medical Sciences. Vol. 4 (2007); p. 53-58.

HUANG, D; OU, B y PRIOR, L. The chemistry behind Antioxidant capacity assays. **En:** Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 53 (2005); p. 1841-1856.

IMEH, U. y KHOKHAR, S. Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. **En:** Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 50 ( 2002); p. 6301-6306.

JINAP, S. Organic Acids in cocoa beans-a review. ASEAN Foods Journal. N° 9 (1994); p.3-12.

KEALEY, K. S.; SNYDER, R. M.; ROMANCZYK, L. J.; GEYER, H. M.; MYERS, M. E.; WITHCARE, E. J.; HAMMERSTONE, J. F. y SCHMITZ, H. H. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses. **En:** Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 98/09533, Mars Incorporated, USA (2001).

KIM, H. y KEENEY, P. G. (-) Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. **En:** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 47 (1994); p. 3693–3701.

KINSELLA, JE; FRANKEL, E; GERMAN, B. y KANNER J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **En:** Food Technology. Vol. 85 (1993); p. 9.

KONO, Y.; SHIBATA, H.; KODAMA, Y. y SAWA, Y. The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. **En:** Biochemistry. Vol. 312 (1995); p. 947–953.

KUSKOSKI, M. y ASUERO, A. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS. **En:** Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas. Vol. 24(2004); p. 691-693.

LANGE, H. y FINCKE, A. Kakao und Schokolade. In L. Acker, K.-G. Bergner, y W. Diemair. Handbuch der Lebensmittel Band VI: Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz. **En**: New York: Berlin, Heidelberg Springer Verlag; 1970; p. 210-309.

LAI, L; CHOUS, S; CHAO, W. Studies on the antioxidative activities of hsian-tsoo (*Mesona procumbens* hemsl) leaf gum. **En**: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49(2001); p. 963–968.

LUNA, F. Chemical Composition And Flavor Of Ecuadorian Cocoa Liquor. **En**: Journal of Agricultura Chemical. N° 50 (2002); p. 3527-3532.

MANUALES PARA EDUCACIÓN AGROPECUARIA. Cultivos de plantación. Área Producción Vegetal. 22 Trillas. México (1987); p 22-24.

MILLER K.; STUART D.; SMITH, N.; LEE, C.; MCHALE, N.; FLANAGAN, J.; OU, B. y HURST, W. Antioxidant Activity and Polyphenol and Procyanidin Contents of Selected Commercially Available Cocoa-Containing and Chocolate Products in the United States. **En**: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 54 (2006); p. 4062-4068.

MINIFIE, B. W. Chocolate, cocoa and confectionary: Science and technology. **En**: New York: Chapman & Hall (1989).

MORAES-DE-SOUZA, R.; OLDONI, T.; REGITANO-D'ARCE, M. Y ALENCAR M. Actividad antioxidante y compuestos fenólicos en infusiones herbarias. **En**: Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol 6 No 1 (2008); p.57-60.

NAZARUDDIN, R. Effect of pulpe preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. **En**: Industrial Crops and Products. Vol. 24 (2006); p. 87- 94.

NORUMA, T.; KIKUCHI, M.; KAWAKAMI, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl (DPPH). **En:** Biochem. Mol. Biol. Int. Vol. 42 (1997); p. 361-370.

NINFALI, P Y BACCHIOCCA, M. Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. **En:** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 51(2003); p; 2222-2226.

OBSERVATORIO AGROCADENAS DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA. Estadísticas, La cadena de Cacao. Acceso, Marzo 13 de 2007. [http://www.agrocadenas.gov.co/cacao/cacao\\_reportes.htm](http://www.agrocadenas.gov.co/cacao/cacao_reportes.htm)

OTHMAN, A; ISMAIL, A; GHANI, N; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. **En:** Food Chemistry. Vol 100 (2005); p. 1523-1530.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **En:** Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 49 (2001); p. 4619-4926.

OZYURT, D.; DEMIRATA, B. y APAKB, R. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. **En:** Talanta. Vol. 71 (2007); p. 1155–1165.

PAIVA-MARTINS, F. y GORDON, M. Effects of pH and Ferric Ions on the Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Oil-in-Water Emulsions. **En:** JAOCS, Vol. 79 (2002); p. 571-576.

PEREA, J.; ESPINOSA, A. y OTERO, V. Fermentación y secado de los granos de cacao. **En:** Tecnología par le mejoramiento del sistema de producción de cacao. Bucaramanga. Corporación Colombia de Investigación Agropecuaria Regional Siete CORPOICA, (2000); p. 123.

PINZON, U. y ROJAS, A. El beneficio y características físico-química del cacao. Bucaramanga. **En:** Federación Nacional de Cacoteros Fondo Nacional del cacao; (2004); p. 21-30.

PRATICO D. y DELANTY N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **En:** American Journal Medical. Vol. 109 (2000); p. 577-585.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **En:** Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 51 (2003); p. 3273-3279.

PRIOR, R.; WU, X. y SCHAICH K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **En:** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53 (10) (2005); p. 4290 -4302.

RAMIRO, E.; FRANCH A.; CASTELLOTE, C.; ANDRE´S-LACUEVA, C., IZQUIERDO-PULIDO, M. y CASTELL, M. Effect of Theobroma cacao flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. **En:** British Journal of Nutrition. Vol. 93 (2005); p. 859–866.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTE, A.; PANNALA A.; YANG M. y RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved radical cation decolorization assay. **En:** Free Rad. Bio. Med. Vol. 26 (1999); p. 1231-1237.

REIN, D.; PAGLIERONI, T. G.; WUN, T.; PEARSON, D. A.; SCHMITZ, H. H.; GOSSELIN, R. y KEEN, C. L. Cocoa inhibits platelet activation and function. **En:** Journal Nutrition. Vol. 130 (2000); p. 2120S–2126.

RICHELE, M.; TAVAZZI, I.; ENSLEN, M. y OFFORD, E. A. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. **En**: Eur. Journal Clinical Nutrition, Vol. 53 (1999); p. 22–26.

ROW, H. R.; JIN, Y.; Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction, Bioresour. **En**: Technol.Vol. 97(2006); p. 790-793.

SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S. y OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from Theo-broma cacao. **En**: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 46(2) (1998); p. 454-457.

SHAI, F. y NACZK M. Food phenolics. **En**: Sources, chemistry, effects applications (1995). p. 281-319.

SINGLETON, V. L. y ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **En**: America Journal of Enology and Viniculture. Vol. 16 (1965); p. 144-158.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. **En**: Free radical Biology Medicine. Vol. 8 (1990); p. 583-599.

TANAKA, T; KONDOU, K. y KOUNO, J. Oxidation and epimerization of epigallocatechin in banana fruit. **En**: Phytochemistry. Vol. 62 (2000); p. 311-316.

TOMLINS, K.; BAKER, D.; DAPLIN, P. y ADOMAKO, D. Effect of fermentation and drying practices in the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. **En**: Food Chemistry. Vol. 46 (1993); p. 257-263.

URBANSKI, J. Chocolate Flavor origins and descriptions the effects of process and bean source. The manufacturing confectioner (1992); p. 69-80.

VÁZQUEZ MARTÍNEZ, C.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; RIBAS, L.; SERRA, LI. y HERCBERG, S. Estudio suvimax (francia): el papel de los antioxidantes en la prevencion del cancer y la enfermedad cardiovascular. **En:** Revista Española de Salud Pública. Vol. 72 (1998); p. 173-183.

VELIOGLU, Y.; MAZZA, G.; GAO, L. y OMAH B. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. **En:** Journal Agricultural Food Chemistry. Vol. 46 (1998); p. 4113-4117.

WANG, H y HELLIWELL, K. Epimerisation of catechins in green tea infusion. **En:** Food Chemistry. Vol. 70 (2000); p. 337-344.

WATERHOUSE, A.; SHIRLEY, J. R. y DONOVAN, J. L. Antioxidants in chocolate. **En:** Lancet, (1996); p. 348-834.

WEISBURGUER, J. Chemoprventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases. **En:** American Health Foundation, (2001); p. 891-897.

WITZTUM, JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **En:** The Lancet. Vol. 344 (1994); p. 793-795.

WOLLGAST, J. y ANKLAM E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufactured of chocolate methodology for identification and quantification. **En:** Food Research Intenational. Vol. 33 (2000); p. 423-447.

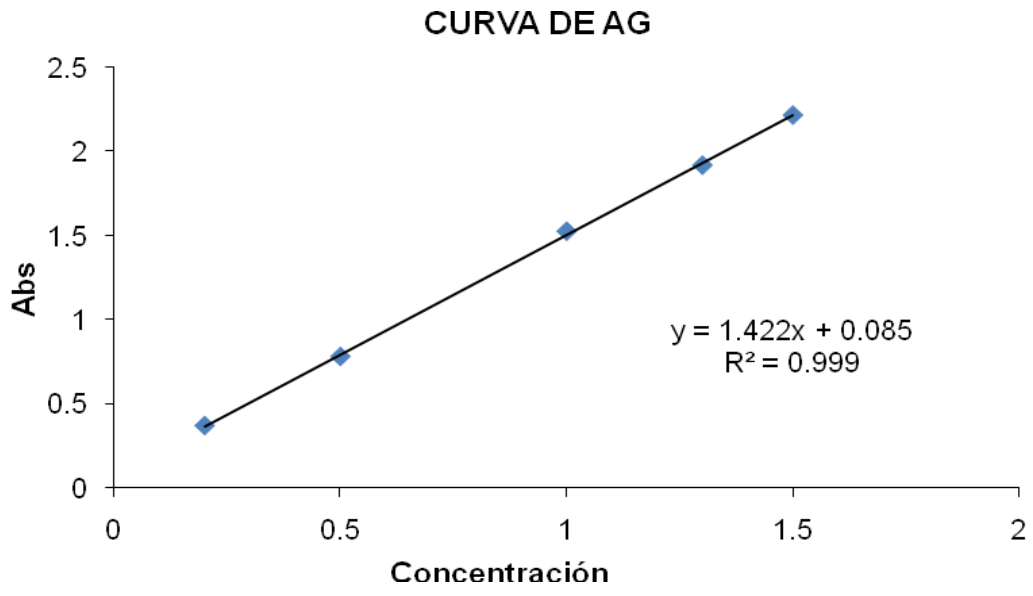
WOLLGAST, JAN. The contents and effects of polyphenols in chocolate, Qualitative and quantitative analices of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potencial implications of chocolate in human health. Alemania (2004).Trabajo de doctorado. Instituto de ciencias nutricionales. Facultad de Agricultura y ciencias de nutrición, economía y administración ambiental. Universidad de Gieben.

WRIGHT, J. S.; JOHNSON, E. R.; DILABIO, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **En:** Journal American Chemistry Society. Vol. 123 (2001); p. 1173-1183.

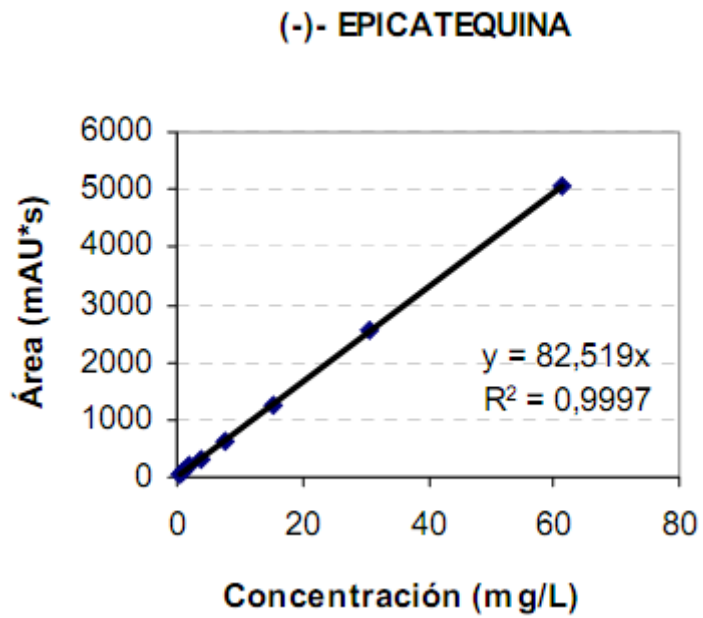
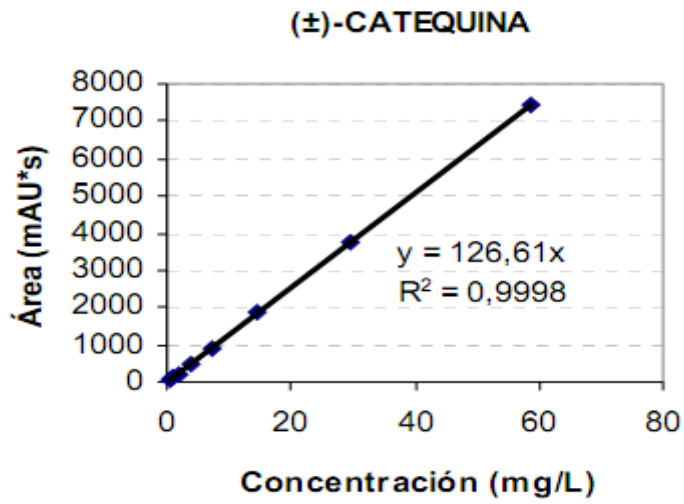
ZUMBÉ, A. Polyphenols in cocoa: are there health benefits? **En:** BNF Nutrition Bulletin. Vol. 23 (1998); p. 94-102.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1.** Curva de calibración para la medición de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

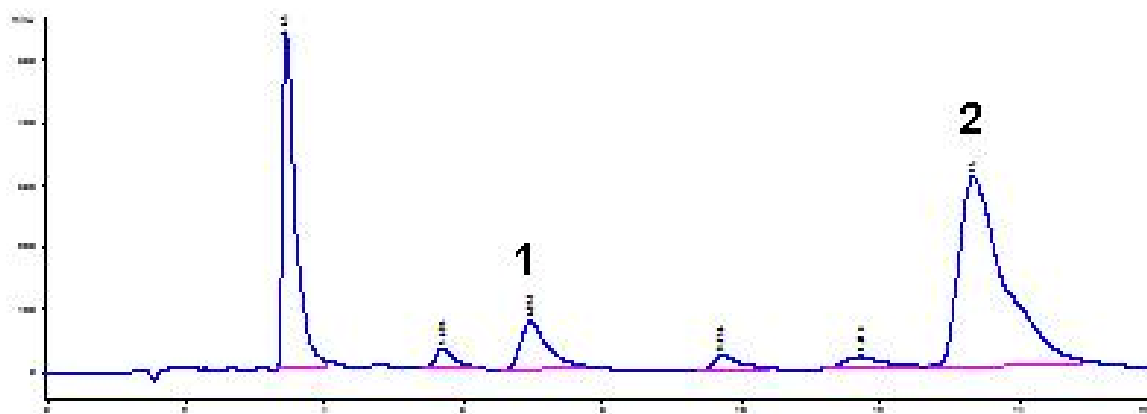


**ANEXO 2.** Curvas de calibración (-)-epicatequina y (±)catequina

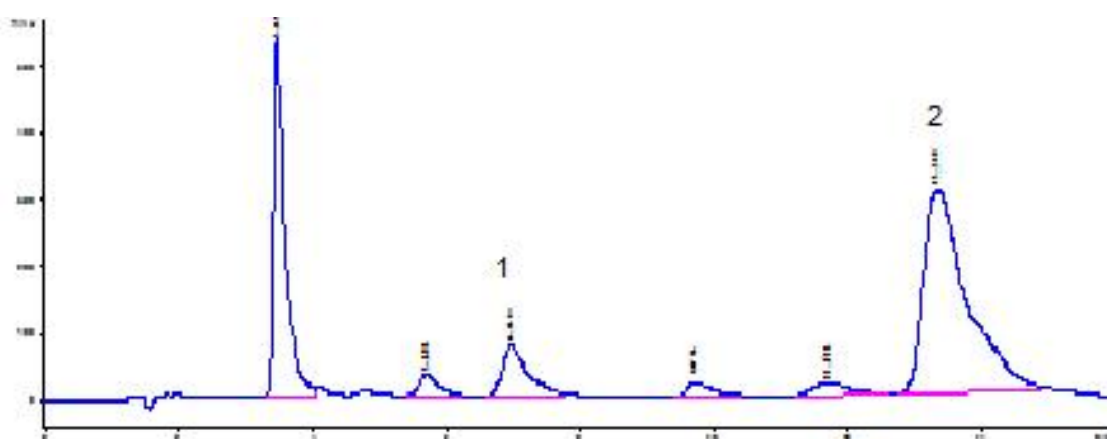


**ANEXO 3.** Cromatogramas de extractos de semilla de cacao, chocolate de mesa amargo, chocolate tradicional, chocolate clavos y canela y chocolate a partir de polvo de cacao por HPLC. **1** ( $\pm$ )-Catequina y **2** (-)-Epicatequina.

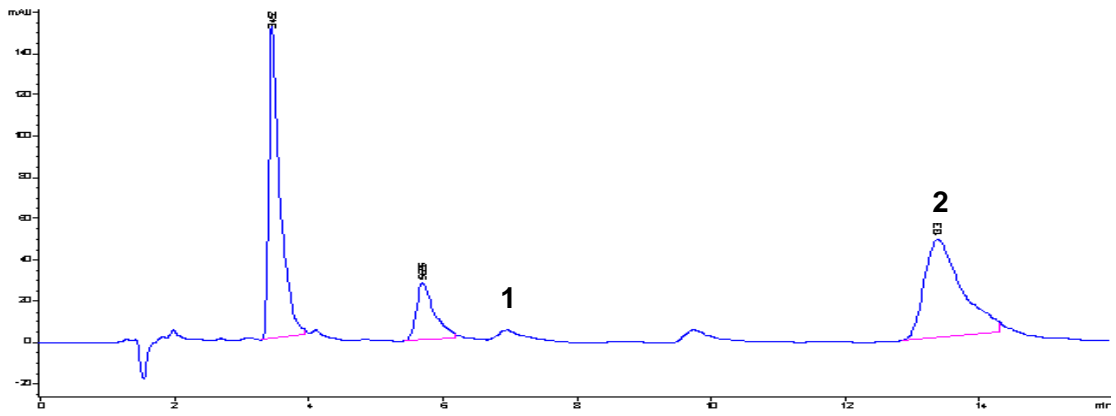
### Semillas de cacao secas y fermentadas



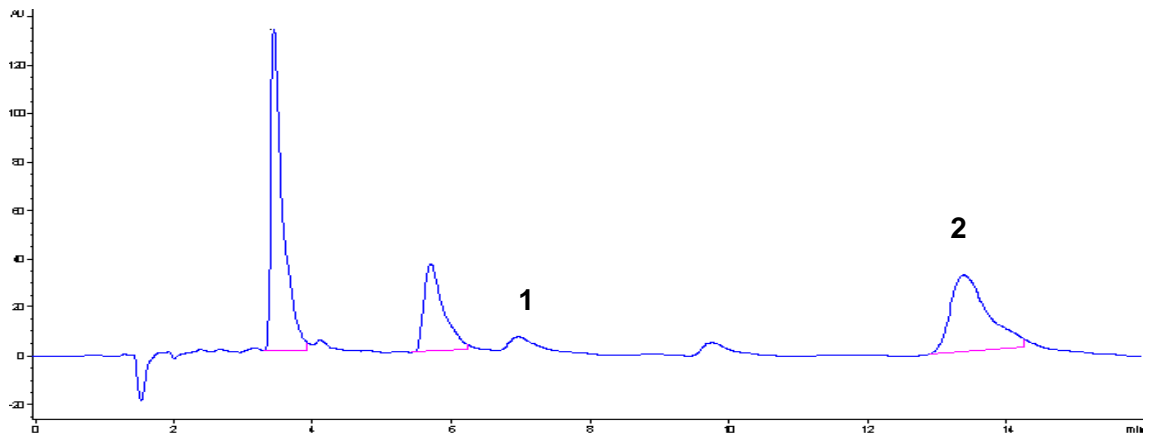
### Chocolate de mesa amargo



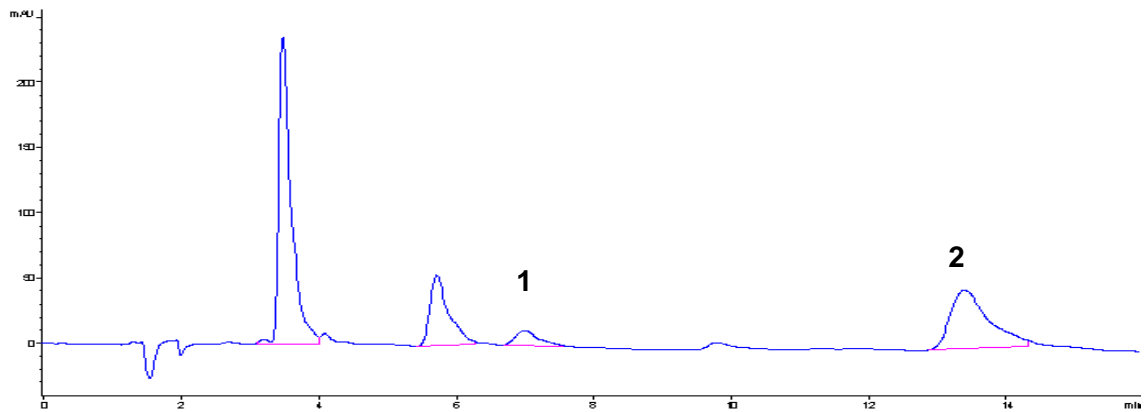
### Chocolate de mesa tradicional



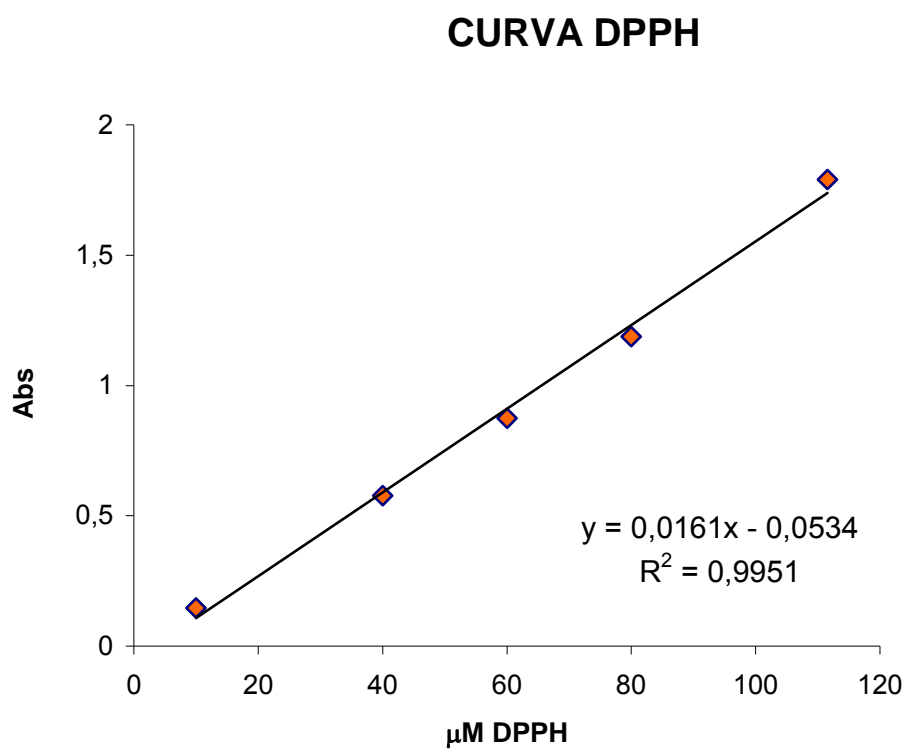
### Chocolate clavos y canela



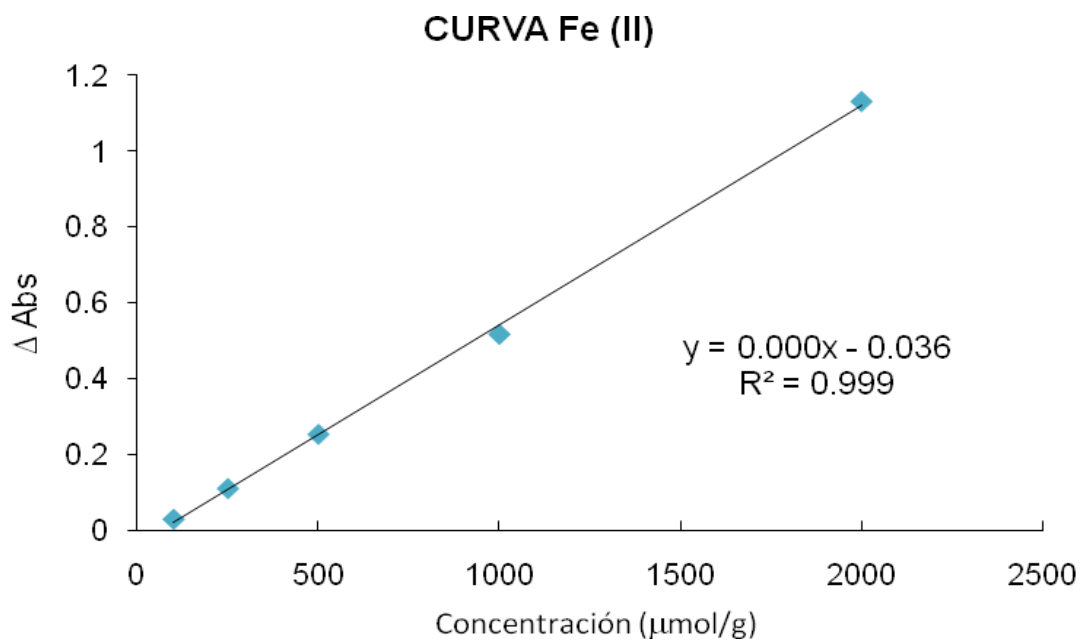
### Chocolate a partir de polvo de cacao



**ANEXO 4.** Curva de calibración del la solución del radical DPPH.



**ANEXO 5. Curva de calibración para el ensayo de potencial de reducción del hierro  
FRAP**



**ANEXO 6.** Curva de calibración para el ensayo de los antioxidantes totales sobre le radical ABTS<sup>+</sup>.

