

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Departamento Académico de Ciencia, Tecnología e Ingeniería de Alimentos



**“POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE (DPPH Y PEROXILO) EN GRANOS DE
CACAO (*Theobroma cacao* L.) COMERCIAL DE TINGO
MARÍA Y TOCACHE”**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

OLIVIA JAKELIN CONDEZO CRESPO

PROMOCIÓN 2010

Tingo María – Perú

2011



Q04

C74

Condezo Crespo, Olivia J.

Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y Peroxilo) en Granos de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Comercial de Tingo María y Tocache – Tingo María, 2011

74 h.; 11 cuadros; 16 figs.; 72 ref.; 30 cm

Tesis (Ing. Industrias Alimentarias). Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

**1. THEOBROMA CACAO L. 2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
3. POLIFENOLES 4. ANTOCIANINAS 5. DPPH 6. PEROXILO
7. COMERCIALIZACION 8. PERU.**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156
Apart. Postal 156 Tingo María E.mail; fia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 11 de Noviembre de 2011, a horas 6:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por la Bach. **CONDEZO CRESPO, Olivia Jakelin**, titulada:

“POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH Y PEROXILO) EN GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) COMERCIAL DE TINGO MARIA Y TOCACHE”

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO** en consecuencia la Bachiller, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51° y 52° del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 11 de Noviembre de 2011

Ing. Mg. Pedro A. Vejarano Jara
Presidente

Ing. Mg. Jorge Castro Gracey
Miembro

Ing. Williams Roldán Carbajal
Miembro

Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez
Asesora

DEDICATORIA

A DIOS, el principio y el fin de todos mis propósitos...Gracias por hacerme ver las maravillas de la vida, y por haber puesto en mi camino a don AQUILES, quien me brindó constante e incondicional apoyo, invaluable y por su bondad y por nunca negarse a escucharme y por hacer las veces de un padre.

A mis abuelitos DIONICO CRESPO y JOSEFA AVILA Q.E.P.D con mucho amor porque siempre me animaron y se preocuparon por mí. Porque como ellos dicen, el conocimiento es progreso.

A mi madre RITA CRESPO AVILA, por el gran esfuerzo que ha hecho para que se realicen mis sueños, por ser siempre mi fuente de confianza y formar realmente un núcleo en mi vida.

A mi hermano ELMER porque ha vivido lo bueno y lo malo y porque siempre estará en mi lado y a mis tíos: NESTOR, DIONICIO, CATALINO y PEDRO por creer en mí, por su apoyo y por su enorme comprensión, paciencia y cariño.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por ser el alma mater en el culminé mi carrera y donde viví muchos momentos dignos de recordar que no hacen indiferente el paso del tiempo.

A la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias por haberme formado como profesional y a todos los docentes de la carrera, por todos sus conocimientos compartidos.

A la Dra. Elizabeth Susana Ordoñez Gómez, por confiar en mí, por su apoyo y enseñanzas y ser un verdadero ejemplo de entrega y dedicación a la investigación.

Al Ing. José Antonio Huanca Melgarejo, por su apoyo técnico y por hacer más sencillo lo que al comienzo resultaba complicado.

A mis amigos: Evil que siempre tenía la respuesta a mis dudas. Julio, que siempre tenía una idea original y tu gran capacidad. A Magali, con quien he compartido experimentos, risas y dilemas de tesis. A Carolina, que siempre me ofreciste tu amistad y tu cariño, eres increíble y divertida. No quiero olvidar a las personas que pasaron brevemente por mi vida pero con las que viví gratos momentos: Lupe, Aurelia, Charo, Joel, Paty... y a todos aquellos que de una u otra manera me apoyaron en la culminación de esta meta. A mis amigas de toda la vida que me entienden y siempre estarán ahí, Elaine y Karem.

Y a ti, Choco, te dedico las últimas líneas porque este trabajo ha sido compartido contigo desde el principio y no hubiera sido posible sin tu comprensión y tus constantes ánimos.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	3
2.1.1. Origen y distribución geográfica del cacao.....	3
2.1.2. Identificación taxonómica.....	4
2.1.3. Composición química y valor nutricional del cacao.....	4
2.1.4. Definición del grano de cacao.....	5
2.1.5. Normas para la comercialización de los granos de cacao.....	6
2.2. Generalidades de los polifenoles.....	8
2.2.1. Descripción.....	8
2.2.2. Estructura y clasificación.....	9
2.3. Generalidades de antocianinas.....	12
2.3.1. Definición.....	12
2.3.2. Estructura química.....	12
2.3.3. Factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas... 14	
2.3.4. Espectro de absorción de las antocianinas.....	17
2.4. Generalidades de antioxidantes.....	17
2.4.1. Definición.....	17
2.4.2. Principales antioxidantes.....	18
2.4.3. Radicales libres.....	19
2.4.4. 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).....	20

de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	34
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
4.1. Cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	41
4.1.1. Determinación de la curva estándar.....	41
4.1.2. Cuantificación de polifenoles totales.	43
4.2. Cuantificación de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	47
4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en dos calidades de granos de cacao comercial Tingo María y Tocache.....	51
4.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1 diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH).....	51
4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical peroxilo.....	55
V. CONCLUSIÓN.....	62
VI. RECOMENDACIONES	63
VII. BIBLIOGRAFIA.....	64
VIII. ANEXO.....	74

2.4.5. Radical peroxilo (ROO ^o).....	21
2.4.6. Efectos benéficos de los antioxidantes.....	23
III. MATERIALES Y METODOS	24
3.1. Lugar de ejecución.....	24
3.2. Materia prima.....	24
3.3. Equipos materiales y equipos.....	25
3.3.1. Equipos de laboratorio.....	25
3.3.2. Materiales de laboratorio.....	26
3.3.3. Reactivos y solventes.....	27
3.4. Métodos de análisis.....	24
3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales.....	24
3.4.2. Cuantificación de antocianinas.....	28
3.4.3. Determinación del coeficiente inhibición (IC ₅₀) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH).....	28
3.4.4. Determinación del coeficiente inhibición (IC ₅₀) radical peroxilo.....	28
3.5. Metodología experimental.....	28
3.5.1. Acondicionamiento de la materia prima.....	28
3.5.2. Preparación de extractos.....	29
3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	30
3.5.4. Cuantificación de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	32
3.5.5. Determinación de la capacidad antioxidante en dos calidades	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química de las almendras (porcentaje peso en fresco).....	5
2. Partes sustituibles de las antocianinas.....	13
3. Importancia biológica de los radicales libres.	20
4. Especies reactivas del oxígeno y sus principales características.....	22
5. Preparación de soluciones de trabajo.	36
6. Preparación de soluciones de trabajo en dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	38
7. Resultados de las absorvancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g).....	41
8. Cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de grano de cacao comerciales de Tingo María y Tocache.....	44
9. Cuantificación de antocianinas totales en dos calidades de granos de cacao comerciales de Tingo María y Tocache.	49
10. Capacidad antioxidante referida al radical DPPH en dos calidades de granos de cacao comercial Tingo María y Tocache.	52
11. Capacidad antioxidante referida al radical peroxilo peroxilo totales en granos dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	56

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de los polifenoles.....	9
2. Estructura general de la antocianina	14
3. Estructura química del 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).....	21
4. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.....	29
5. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en dos calidades de grano de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	32
6. Diseño experimental para la cuantificación de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	34
7. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	35
8. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad antioxidante en dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	38
9. Diseño experimental para la evaluación de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante.....	40
10. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.....	42
11. Representación del contenido de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	45
12. Representación del contenido de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial Tingo María y Tocache.....	49

13.	Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	52
14.	Comportamiento del IC ₅₀ con el radical peroxilo en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	56
15.	Análisis de autovectores.....	59
16.	Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de cacao..	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Página

A-I. Análisis de varianza cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra) en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.....	75
A-II. Análisis de varianza contenido de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial "buenos" de Tingo María y Tocache.	75
A-III. Análisis de varianza contenido de polifenoles totales en granos de cacao comercial "defectuosos" de Tingo María y Tocache.	76
A-IV. Análisis de varianza contenido de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g de muestra) en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	76
A-V. Análisis de varianza para antocianinas en granos de cacao comercial "buenos" de Tingo María y Tocache.	77
A-VI. Análisis de varianza para antocianinas en granos de cacao comercial "defectuosos" de Tingo María y Tocache.	77
A-VII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical DPPH en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	78
A-VIII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical DPPH de cacao comercial "buenos" de Tingo María y Tocache.	78
A-IX. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical DPPH de cacao comercial "defectuosos" de Tingo María y Tocache.	79
A-X. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical peroxilo en dos calidades de	

granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.	79
A-XI. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical peroxilo de cacao comercial "buenos" de Tingo María y Tocache.	80
A-XII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical peroxilo de cacao comercial "defectuosos" de Tingo María y Tocache.	80
A-XIII. Coeficiente de correlación de granos cacao comerciales (buenos y defectuosos) acopiados en Tingo María y Tocache.	80
A-XIV. Analisis de componentes princiaples en granos cacao comerciales (buenos y defectuosos) acopiados en Tingo María y Tocache.	81

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del (CIPNA – CIDBAM) – UNAS. Los objetivos fueron: cuantificar el contenido de polifenoles totales, antocianinas y determinar la capacidad antioxidante por su capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) y peroxilo en dos calidades de granos de cacao comercial (buenos y defectuosos) de Tingo María y Tocache. Las muestras fueron molidas y desgrasadas por el método Folch. Se preparó extractos hidroalcohólicos que consistió en pesar 10 g de cacao en 100 mL (agua/etanol 50:50v/v), macerado por 24 h, filtrado y centrifugado a 10000 rpm/10min/4 °C. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial 2*4*2, en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$), para ello se utilizó el programa SAS versión 9.0 (Español). Para analizar todos los tratamientos de manera conjunta se utilizó el análisis multivariado con componentes principales, para este análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2011. Los contenidos de polifenoles totales en granos de cacao comerciales variaron entre $4,150 \pm 0,07$ a $6,356 \pm 0,05$ g EAG/100 g. Los contenidos de antocianinas en granos de cacao comerciales estuvieron entre $1,728 \pm 0,10$ a $12,209 \pm 0,20$ mg cianidina-3-glucósido/g. Con respecto a la capacidad antioxidante frente al radical DPPH se encontró un IC_{50} de $51,310 \pm 0,47$ a $85,380 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$, y la capacidad antioxidante con el radical peroxilo fluctuó entre IC_{50} $8,174 \pm 0,07$ a $14,289 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$.

I. INTRODUCCION

El cacao (*Theobroma cacao* L.), pertenece a la familia Esterculiaceae, es originario de la Amazonía, es un árbol tropical que crece en zonas cálidas y húmedas; se ha dispersado por todo el continente y es muy usado en la industria del chocolate y sus derivados. Estos productos son consumidos por todo el mundo por su flavor y aroma; ya que no pueden ser reemplazados por otras plantas; además tiene importancia en la industria cosmética y farmacéutica. Los granos de cacao poseen compuestos diversos tales como: los polifenoles, flavonoides, antocianinas, proantocianinas, etc. con propiedades antioxidantes y antiradical in vitro.

El Valle del Alto Huallaga reúne las condiciones medio ambientales necesarias para el cultivo de cacao y cuenta con varios ecotipos de cacao, el cual se refleja en el alto rendimiento por hectárea; en los últimos años la demanda en el mercado externo se ha venido incrementando debido a la buena calidad de las semillas y básicamente porque el consumo regular de los productos del cacao como agentes terapéuticos influyen favorablemente en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares e incluso en otras patologías como el cáncer. En este marco con los resultados se logró inferir las propiedades antioxidantes reales que tiene los granos de cacao comercial; la comercialización de los granos de cacao de los pequeños agricultores son muy

heterogéneos lo que permite obtener diferentes calidades de productos procesados; tanto en su composición fisicoquímica, sensorial y en los fitonutrientes, mediante la presente investigación se logró demostrar el grado de influencia de la heterogeneidad de granos en el producto final; para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Cuantificar el contenido de polifenoles totales y antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial (buenos y defectuosos) de Tingo María y Tocache.
- Determinar la capacidad antioxidante en dos calidades de granos de cacao comercial (buenos y defectuosos) de Tingo María y Tocache por su capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) y peroxilo.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cacao (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1. Origen y distribución geográfica del cacao

HARDY (1970), se cree que el árbol de cacao es originario de la Amazonía y que más tarde se extendió a América Central, en especial a México. Las culturas nativas de esta región, por ejemplo los Olmec y los Mayas ya lo conocían y utilizaban, lo consideraban como “el alimento de los Dioses”.

El cacao es una especie originaria del bosque húmedo tropical en América del Sur. Geográficamente en el mundo las mayores áreas cacaoteras están concentradas entre los 10º de latitud norte y sur del Ecuador, distribuida en el oeste Africano, América Latina y sur este de Asia (ARÉVALO, 2004).

WOOD (1982), menciona que el cacao (*Theobroma cacao* L), es un árbol pequeño que se encuentra en la cuenca del amazonas y otras regiones tropicales de centro y Sur América, es una de las 22 especies que constituyen el género *Theobroma*. La misma que es nativo del nuevo mundo y la especie se extiende en América del Sur, México hasta Brasil y Bolivia, su centro de origen está en la cuenca del Amazonas y el Orinoco.

CHESMAN (1944), indica que el cacao es una especie endémica de América del Sur cuyo centro de origen está localizado en la región que comprende la cuenca de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo, tributarios del río

Amazonas.

2.1.2. Identificación taxonómica

ADRIAZOLA (2003), indica la siguiente clasificación taxonómica.

Nombre científico	:	<i>Theobroma cacao</i> L.
Nombre común	:	Cacao
Origen	:	América Latina
Reino	:	Vegetal
Orden	:	Málvales
Clase	:	Dicotiledóneas
Familia	:	Esterculiaceae
Tribu	:	Birtheriaceae
Género	:	<i>Theobroma</i>
Especie	:	<i>Theobroma cacao</i> L.
División	:	Spermatophyta
Sub división	:	Angiosperma

2.1.3. Composición química y valor nutricional del cacao

La composición química de los granos de cacao y de sus subproductos es muy compleja, cambiando a lo largo del crecimiento del grano y dependiendo del proceso al cual este es sometido (GONZALES *et al.*, 2007)

La composición y el valor nutricional del cacao varían de acuerdo a la variedad y otros factores (suelo, condiciones climáticas y labores culturales). En el Cuadro 1 se presenta la composición química de las almendras.

Cuadro 1. Composición química de las almendras (porcentaje peso en fresco).

Componentes	Cotiledones (%)	Pulpa (%)	Cáscara (%)
Agua	35,0	84,5	9,4
Celulosa	3,2	—	13,8
Almidón	4,5	---	46,0
Pentosa	4,9	2,7	---
Sacarosa	---	0,7	---
Glucosa	1,1	10,0	---
Grasa	31,3	---	3,8
Proteína	8,4	0,6	18,0
Teobromina	2,4	---	---
Cafeína	0,8	---	---
Polifenoles	5,2	---	1,6
Ácidos	0,6	0,7	---
Sales	2,6	0,8	8,2

Fuente: SULLCA (1992).

2.1.4. Definición del grano de cacao

ITINTEC (1994), define al grano de cacao como la semilla proveniente del cacaotero, sana, fermentada adecuadamente secada, privada de mucilago y de la cáscara del fruto. GONZALES *et al.* (2007), indican que las almendras del cacao (*Theobroma cacao* L.), constituyen el insumo básico para la industria del chocolate y sus derivados; la industria cosmética y

farmacéutica.

ADRIAZOLA (2003), establece las siguientes definiciones:

- Grano fermentado: Es aquel grano de cacao cuyo proceso de fermentación ha sido completo y adecuado y que presenta las siguientes características: cáscara o tegumento de color marrón, rojizo o pardo rojizo oscuro (color chocolate), que se desprende fácilmente de la almendra, con cotiledones bien definidos de forma arriñonada, con olor agradable y sabor medianamente amargo.
- Grano seco: Es aquel grano de cacao fermentado adecuadamente que ha sido secado de modo uniforme y cuyo contenido de humedad no es mayor que 7,5%.
- Nibs: Es la expresión empleada para denominar el grano de cacao tostado, partido, sin cáscara ni impurezas.

2.1.5. Normas para la comercialización de los granos de cacao

La calidad del grano es muy importante para los fabricantes de chocolate como son el tamaño del grano, el porcentaje de cáscara y el contenido de grasa. El reglamento modelo define la calidad comercial como sigue:

- El cacao de calidad comercial debe estar fermentado, bien seco, libre de granos ahumados, de olores anormales o extraños o libres de muestras de adulteración.
- Debe estar razonablemente libre de insectos vivos.
- Debe ser razonablemente conforme en tamaño, libre de granos

quebrados, fragmentos y trozos de cáscara y virtualmente libre de materia extraña.

- **La prueba de corte**

Es el método que se usa para evaluar la calidad según se define ésta en las normas y al revelar el color de los colores secos también sirve de guía respecto al grado de fermentación, proporcionando una orientación. La prueba consiste en cortar longitudinalmente 300 g tomados de una muestra al azar del lote de cacao que se está calificando en su calidad. Después de cortar los granos, se cuentan aquellos defectuosos tales como:

- **Granos mohosos:** Son aquellas que en sus partes internas tienen moho visible a simple vista. Este es el defecto más grave de los granos de cacao y resulta inconveniente debido a que la presencia de granos mohosos afecta el sabor del chocolate terminado más no afecta el proceso.

- **Granos pizarrosos:** Se definen como los que tienen color pizarra en la mitad o más de la superficie expuesta por un corte longitudinal practicando por el centro del grano. El color pizarra es característico y se distingue fácilmente de otros colores con el cotiledón, tanto antes como después de la fermentación.

- **Granos infestados:** Son granos que han sido atacados por diversas plagas de productos almacenados.

- **Granos germinados:** Son considerados como defectos, debido a la perforación que deja en la testa la radícula al emerger, ofrece una vía de entrada para que las palomillas e insectos invadan los granos.

- **Granos planos:** Son aquellos que no tienen cotiledones y por lo

tanto no son utilizables (WOOD, 1982).

- **Grano violáceo (insuficientemente fermentado):** Es aquel grano de cacao que presenta un color violáceo, por lo menos en la mitad de su superficie, cuando se hace un corte longitudinal a través del centro del grano.
- **Grano múltiple:** Son dos o más granos unidos íntimamente por una de sus caras con restos de mucilagos.
- **Grano atrofiado:** Es aquel grano de cacao cuyos cotiledones han quedado demasiado delgados para cortarse y lograr así una superficie de cotiledón.
- **Grano partido:** Es el grano de cacao roto o fragmentado (INDECOPI, 2007).

2.2. Generalidades de los polifenoles

2.2.1. Descripción

Los compuestos polifenólicos, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados como metabolitos secundarios. Se caracterizan por la presencia de más de un grupo de fenol por molécula, estas moléculas son importantes para la fisiología de las plantas porque contribuyen a la resistencia al ataque de microorganismos, insectos y ayudan a preservar su integridad debido a su exposición a ambientes estresantes incluyendo radiaciones ultravioleta y temperaturas relativamente altas (ZHAO *et al.*, 1999).

Los frutos, en adición a los nutrientes esenciales y a una serie de micronutrientes tales como minerales, fibras y vitaminas, aportan además diversos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, denominados

polifenoles (KUSKOSQUI *et al.*, 2005).

La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y secuestradores de oxígeno singlete; además de tener potencial para quelar metales (HOPIA *et al.*, 1999).

2.2.2. Estructura y clasificación

UGARTONDO (2009), menciona que desde el punto de vista químico, los polifenoles se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (grupo fenol); la estructura de los polifenoles varía de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, a estructuras complejas, como los taninos condensados. Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. En la siguiente figura se presenta la estructura química de algunos polifenoles.

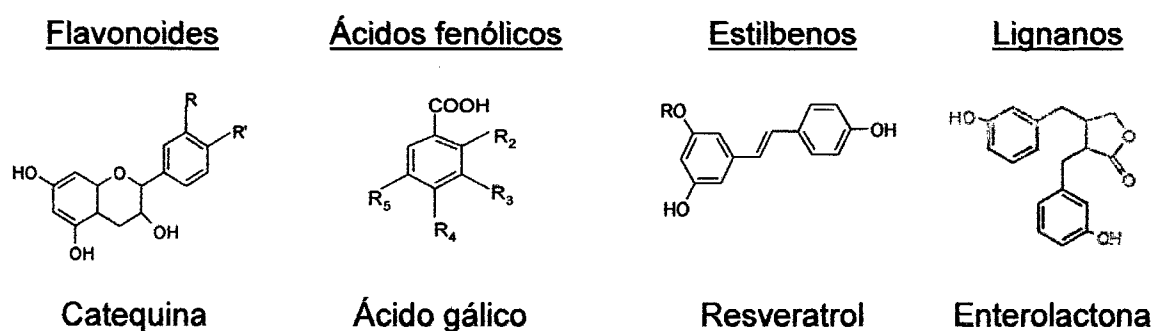


Figura 1. Estructura química de los polifenoles.

2.2.2.1. Flavonoides

HAVSTEEN (1983), menciona que los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición lo que les confiere una gran capacidad antioxidante.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (MARTINEZ *et al.*, 2002).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos naturales presentes en grandes variedades de vegetales, frutas y bebidas; muchos de ellos considerados como fuente importante de antioxidantes, lo que pueden interactuar directamente con especies reactivas de oxígeno e inhibidores de la lipoperoxidación (GONZÁLES-TORREZ *et al.*, 2000).

UGARTONDO (2009), indica que los flavonoides son polifenoles de bajo peso molecular formados por la combinación de derivados de fenilalanina y el ácido acético; comparten una estructura común caracterizada por tener un esqueleto difenilpropano ($C_6C_3C_6$) basado en el núcleo flavonoide formado por tres anillos conocidos como A, B y C. El anillo aromático A está condensado con un anillo de seis carbonos (C), un heterociclo oxigenado, que en posición dos tiene un anillo bencénico como sustituyente (B).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (BORS *et al.*, 1990).

DAS (1994), manifiesta que los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de la luz de la fotosíntesis durante el cual cataliza el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y también de unidades de acetato (HALLER y FORKMANN, 1993).

La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides (WAGNER y FARKAS, 1975).

2.2.2.2. Ácidos fenólicos

ODRIOZOLA (2009), indica que los ácidos fenólicos son compuestos no flavonoides más estudiados y se caracterizan por tener un ácido carboxílico funcional. Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxinámico. Ejemplos de los derivados del ácido hidroxibenzoico son el ácido p-hidroxibenzoico, gálico y elágico, dentro de los ácidos hidroxicinámico los que se encuentran en mayor proporción en frutas son los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico. Generalmente los ácidos fenólicos están presentes en diversas formas conjugadas, siendo más frecuentes como ésteres que como glucósidos.

2.3. Generalidades de antocianinas

2.3.1. Definición

VARGAS *et al.* (2002), menciona que las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos que se hallan en las células epidermales o subepidermales de la planta, principalmente en flores y frutos.

Para la industria, tienen un potencial considerable en la rama alimentaria como aditivo, por su carácter inocuo (STRACK y WRAY, 1994).

Las antocianinas pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, particularmente de los flavonoides, que se caracterizan por su solubilidad en agua y por sus colores brillantes (SALINAS *et al.*, 2005). Son parte de los pigmentos de las flores y ocasionalmente de hojas, tallos y raíces; su gama abarca desde el color rojo hasta el azul (LÓPEZ *et al.*, 2007).

Las antocianinas tienen un carácter antioxidante, por lo que su consumo puede suponer un beneficio para la salud, ya que disminuyen los niveles de colesterol, proveen protección contra las enfermedades cardíacas y previenen ciertos tipos de cáncer (ROSALES, 2003).

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio (POO, 2005).

2.3.2. Estructura química

Las antocianinas son de color rojo y violeta, solubles en agua, y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, formadas por una molécula de antocianidina (aglicón) que se une a una fracción de carbohidrato a través de

un enlace β -glucosídico. La estructura química de los antocianidinas consiste en un grupo flavilo que a la vez está formado por una molécula de benzopirano unida a un anillo fenílico; los monosacáridos comúnmente encontrados son: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa; entre todas las antocianidinas que se conocen actualmente, las más importantes son la pelargonidina, la cianidina, la delphinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina, (BADUI, 1981 y QUINTERO, 2004), tal como se presenta en el siguiente Cuadro.

Cuadro 2. Partes sustituibles de las antocianinas.

Aglicona	Sustitución		λ max (nm)
	r1	r2	espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delphinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Fuente: QUINTERO, 2004.

Las antocianinas son glucósidos solubles en agua de antocianidinas y son parte de los compuestos fenólicos conocidos como flavonoides con un anillo-A benzoil y un anillo-B hidroxicinamoil. La estructura de la antocianina es el 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio (QUINTERO, 2004).

La estructura química consiste en un grupo flavilo formado por un anillo de benzopirano unido a un anillo fenílico. En la Figura 2 se muestra la estructura general de las antocianina (ACEVEDO, 2003).

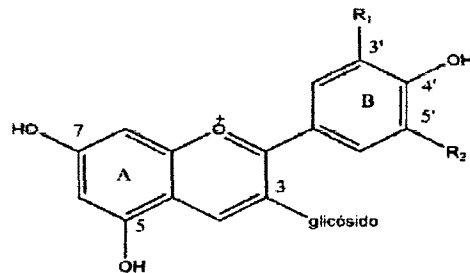


Figura 2. Estructura general de la antocianina

2.3.3. Factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas

- pH

En soluciones muy ácidas ($\text{pH} < 0,5$) el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de pH la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación da lugar a la base incolora del carbinol. Entre pH 4 y 5,5 habrá poco color, ya que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio la cual se desplazará a las formas incoloras. Por lo tanto, la forma chalcona es la más susceptible a la degradación y la forma iónica flavilio es la más estable. Con esto se sabe que una de las desventajas de las antocianinas como colorantes de alimentos es la ausencia de color en soluciones ligeramente ácidas o neutras (HERNÁNDEZ, 2003).

Se puede decir que las antocianinas actúan como indicadores ácido-base puesto que el color resultante está en función de la estructura que

se encuentre en mayor proporción a determinados pH. A pH muy bajos se forma el catión flavilo (rojo), a medida que incrementa el pH se forma la base quinoidal (anhidra) del color azul, en un medio alcalino, aparece el carbinol. En condiciones básicas fuertes (pH 7) se produce daño irreversible en el pigmento con la aparición de una chalcona de color amarillo pálido (ACEVEDO, 2003).

- **Azúcares**

Los azúcares a altas concentraciones estabilizan a las antocianinas, esto es debido a que a altas concentraciones se tiene una baja actividad del agua, que es uno de los factores de degradación de las antocianinas, por el ataque nucleofílico al catión flavilo que ocurre en el C-2 formando la base carbinol incolora. Por otro lado, cuando los azúcares están en bajas concentraciones no tendrán efecto sobre la actividad del agua, provocando que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleren la degradación de las antocianinas (HERNÁNDEZ, 2003).

- **Oxígeno**

El oxígeno molecular hace muy susceptible a la molécula insaturada de la antocianina. Las antocianinas son rápidamente oxidadas y degradadas cuando éstas se encuentran principalmente en su forma quinoidal. Por lo tanto la remoción de dicho oxígeno genera una prevalencia más amplia del color, por lo que el procesado de los alimentos con antocianinas se lleva a cabo bajo condiciones de vacío o nitrógeno (HERNÁNDEZ, 2003).

- **Ácido ascórbico**

Se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas, ya que forma peróxido de hidrógeno durante la oxidación del mismo; esta reacción se acelera en presencia de cobre y es inhibida en presencia de flavonoles como la quercetina. El H_2O_2 actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en C_2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina. Estos productos de degradación son totalmente destruidos y polimerizados para formar precipitados cafés (HERNÁNDEZ, 2003).

- **Temperatura**

El efecto de la temperatura en la estabilidad de antocianinas en sistemas modelos y en productos alimenticios ha sido estudiado por muchos investigadores; el consenso general es que los pigmentos antocianínicos son notoriamente destruidos por el calor durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, existe un incremento logarítmico con un incremento aritmético de la temperatura. Cuando las soluciones de antocianinas se secan por aspersion, a temperaturas mayores a $100^{\circ}C$, ocurre una degradación de color, mientras que a las temperaturas por debajo de los $90^{\circ}C$ resulta en una degradación mínima (ACEVEDO, 2003).

La estabilidad de la antocianina está directamente relacionada con la temperatura. Las conversaciones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas, resisten bien los procesos térmicos alta temperatura–corto tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de $60^{\circ}C$ se

degradan según una cinética de primer orden; en general, las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosiladas o acetiladas (HERNANDEZ, 2003).

2.3.4. Espectro de absorción de las antocianinas

El espectro de absorción de los flavonoides se caracteriza por tener dos bandas separadas, una a longitudes de onda largas (Banda I) determinada por la conjugación del anillo B y la segunda en la región ultravioleta (Banda II) determinada por la conjugación del anillo A. A mayor sustitución del anillo B, la absorbancia máxima de las antocianinas se desplaza hacia el extremo del rojo del espectro (ACEVEDO, 2003).

2.4. Generalidades de antioxidantes

2.4.1. Definición

Antioxidante es una sustancia, que a bajas concentraciones reduce, retrasa o previene la oxidación de un sustrato significativamente. Los antioxidantes son compuestos que prolongan la vida útil de los alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación. Los antioxidantes inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color. Los antioxidantes se clasifican en antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos (SIES, 1997).

Gran parte lo componen los compuestos fenólicos que intervienen como oxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos, supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes (VASCONCELLOS, 2000).

Los antioxidantes ejercen acción en todos los procesos en los que se reduce la oxidación de radicales libres totales como: 1) inhibición de radicales libres, 2) hidrólisis enzimático de enlaces ésteres para remover ácidos grasos peróxidos de lípidos, 3) quelantes de iones metálicos de transición y 4) reducción de peróxidos por catálisis enzimático (THOMAS, 2000).

2.4.2. Principales antioxidantes

- **Antioxidantes endógenos**

Los antioxidantes endógenos o antioxidantes enzimáticos, actúan a nivel celular. Existe tres sistemas principales de enzimas antioxidantes: 1) Superóxido dismutasa (SOD), 2) Catalasa (CTL) y 3) Gutación peroxidasa (GPX) (GONZALEZ *et al.*, 2000).

- **Antioxidantes exógenos**

Los antioxidantes exógenos o no enzimáticos, transforman los radicales libres en menos agresivos. Entre ellos tenemos: Flavonoides, alfa tocoferol (vitamina E), beta caroteno, vitamina C, glutatión y urato (POLYAKOV *et al.*, 2001).

2.4.3. Radicales libres

Cualquier molécula o átomo que contiene uno o más electrones desapareados es un radical libre (ANDERSON y PHILLIPS, 2001).

Son químicamente inestables, altamente reactivos y pueden causar lesiones severas a los tejidos vivos, debido a su habilidad para generar perturbadoras reacciones químicas en cadena, en su intento por recobrar la estabilidad de los electrones (REILLY y BULKEY, 1990).

El desbalance entre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno Reactivo (EROS) y la defensa antioxidante, provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

El estrés oxidativo está asociada a: 1) Enfermedades inflamatorias: artritis, vasculitis; 2) Enfermedades del corazón; 3) Ischemia intestinal, síndrome de inmunodeficiencia adquirida; 4) Úlceras gástricas; 5) Enfermedades de alzhéimer; 6) Parkinson y muchas otras (ANDRIOLI, 2000).

2.4.3.1. Formación de radicales libres

Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000).

Los sistemas biológicos producen radicales libres mediante diversas reacciones, procesos oxidativas normales dentro de las células. Fuentes exógenas incluyen a los efectos de la radiación ionizante sobre las

moléculas orgánicas y a la degradación térmica de la materia orgánica (como la combustión de tabaco) (DIPLOCK, 1991).

El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina, ácidos grasos *trans* como las grasas de la carne y la leche también contribuyen al aumento de los radicales libres (AVELLO y SUWALSKY, 2006).

2.4.3.2. Importancia de los radicales libres

Una gran variedad de procesos metabólicos derivan de la producción de radicales libres y compuestos reactivos de oxígeno. En el siguiente Cuadro se presenta la importancia biológica de algunos radicales libres.

Cuadro 3. Importancia biológica de los radicales libres.

Fórmula	Radical
O_2^{\bullet}	Anión de radical súper oxido.
OH^{\bullet}	Radical de hidroxilo.
ROO^{\bullet}	Radical peróxido.
1O_2	Oxígeno singlete*
H_2O_2	Peroxido de hidrogeno*

(*) Considerados radicales libres por su alta reactividad química.

Fuente: REILLY y BULKEY (1990).

2.4.4. 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)

Es un radical libre estable y se utiliza como indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto que posea actividad

antioxidativa. El principio del método de DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (ejemplo compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina y una especie radical. En este proceso, la reacción desarrolla un cambio de color de violeta a amarillo a medida que disminuye la absorbancia detectable a 515 nm. (LEBEAU *et al.*, 2000).

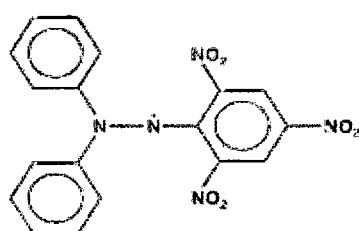
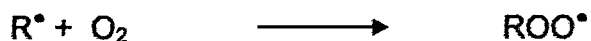


Figura 3. Estructura química del 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).

2.4.5. Radical peroxilo (ROO°)

Son radicales más abundantes en los sistemas biológicos, se originan a partir de la adición de oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonatado. Se forman como intermediarios durante la ruptura de los lípidos peroxidados en las reacciones de la peroxidación lipídica; la formación de ROO° es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la peroxidación lipídica; tal como se presenta en el Cuadro 4.

La peroxidación lipídica de la membrana produce alteraciones de las funciones secretoras y de los gradientes iónicos, numerosos residuos químicos de esta reacción puede difundir del sitio donde se producen y provocar edema, estimular fosfolipasa A₂, inducir la liberación de ácido araquidónico con la consiguiente formación de eicosanoides.



Es un radical más fuerte que el anión superóxido, capaz de atravesar las membranas celulares e iniciar la peroxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (HALLIWELL, 1989).

Cuadro 4. Especies reactivas del oxígeno y sus principales características.

Radical	Nombre	Características
O ₂	Superóxido	Es muy reactivo en un medio hidrofóbico pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas pueden transformarse en peróxido de hidrógeno.
°OH	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente al ADN, proteínas y lípidos.
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno	No es un radical pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos, como el fierro y el cobre.
ONOO ⁻	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado con la patología de varios desórdenes neurodegenerativos, con la enfermedad de alzheimer.
O ₂	Oxígeno simple	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido durante la lipoperoxidación. Juega un papel importante en los procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desordenes degenerativos.

Fuente: GONZALES *et al.* (2000).

2.4.6. Efectos benéficos de los antioxidantes

Los antioxidantes tienen un efecto benéfico, básicamente debido a su capacidad de inhibir radicales libres ejerciendo su acción en todos los procesos en los que se reduce o detiene el proceso de oxidación (THOMAS, 2000).

GONZÁLES *et al.* (2000), manifiestan que los antioxidantes tienen acción potencialmente benéfica para la salud y que constituyen el principio activo de muchas plantas medicinales.

YILDIRIM (2001), hace referencia que el consumo de frutas y vegetales ricos en polifenoles, previenen muchas enfermedades principalmente al corazón.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Análisis de Alimentos y Química de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias y en el Centro de investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA), Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS) ubicada en el Distrito de Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, Región Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09° 17'08" de Latitud Sur, a 75° 59'52" de Latitud Oeste, con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24°C.

3.2. Materia prima

La materia prima de cacao comercial fue obtenido de los centros de acopio (casas comerciales) de la ciudad de Tingo María: comercial Koki ubicado en la Av. Raimondy N° 1089, comercial Gladys ubicado en la Av. Raimondy N° 1081, comercial Durand ubicado en la Av. Raimondy N° 1054, comercial Sayco ubicado en la Av. Raimondy N° 973, Distrito de Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, Región Huánuco y de la ciudad de Tocache: comercial Amazónica ubicada en Av. Aviación 509, comercial Romex ubicado

en Jr. Tocache N° 450, comercial Alto Huallaga ubicada en Jr. Fredy Aliaga N° 1010 y comercial Sullca ubicada en Jr. Fredy Aliaga N° 810, Provincia de Tocache Región San Martín.

La clasificación de la calidad de granos se realizó de la siguiente manera:

Granos buenos: Exento de olores extraños, tamaño, forma y color uniforme.

Granos defectuosos: Grano mohoso, pizarroso, infestado, germinado, plano, violáceo, múltiple, atrofiado y partido.

3.3. Equipos y materiales

3.3.1. Equipos de laboratorio

- Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation) SN 2M6G261002.
- Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión), capacidad 200g y modelo Adventurer Pro AV114 (OHAUS) capacidad 110 g.
- Estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven)
- Congelador FFV-2065 FW -20°C (Frigidaire, USA).
- Refrigerador Icebeam Door Cooling LG modelo GR-5392QLC (Corea).
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead).
- Agitador magnético modelo 625 standard (VWR™ hotplate/stirrer).
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries. SITM).

- Centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich).
- Baño maría modelo YCW-010E (Associated With Cannic, Inc, USA).
- pH – metro (Mettler Toledo Seven Easy) pH 0-14, T° 0-100°C SN 8513902.
- Empacadora Multivac modelo A 300/16.

3.3.2. Materiales de laboratorio

3.3.2.1. Materiales de vidrio

- Matraces erlenmeyer de 250 mL.
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1000 mL.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.
- Tubos de ensayo Gene Mate® de 10 mL.
- Fiolas de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 mL.
- Frascos ámbar de 200mL.
- Embudo.

3.3.2.2. Otros materiales

- Micropipetas 0-10 μ L, 10-100 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L.
- Cubetas de poliestireno, Gene Mate® (1cmx 1cmx4.5cm).
- Tips, FISHERBRAND® (1000 y 200 μ L).
- Microtubos (1,5 -2,00 mL).
- Papel de filtro para análisis cuantitativo sin cenizas, Albet filtration & technology.

- Pinzas.
- Espátulas.
- Gradillas.
- Bolsas trilaminadas de 1 kg.

3.3.3. Reactivos y solventes

- Ácido clorhídrico (HCl) (Merk) pureza 36,5 %.
- Cloruro de potasio (KCl) (sigma) pureza 99.5 %.
- Acetato de sodio (CH₃COONa) (Merk) pureza 99 %.
- Ácido gálico (C₇H₆O₅) al 98.1% Sigma Aldrich.
- Reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu, 2N, Sigma Aldrich.
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) p.a. ISO. Scharlau.
- Etanol al 99,99% Merck KGaA.
- 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azobis (2-amidino-propane) (ABAP; Sigma Aldrich, USA)
- Fosfato de potasio dihidrogenado (Scharlau, UE).
- Agua destilada desionizada (H₂O_{dd}).

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó por el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu, *et al.* 1927, reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2001).

3.4.2. Cuantificación de antocianinas

Se realizó por el método del pH diferencial reportado por POO (2005), donde que las absorvancias deben estar en el rango de 0,4 a 0,6.

3.4.3. Determinación del coeficiente inhibición (IC_{50}) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH)

Se realizó por el método espectrofotométrico de luz visible a 517 nm descrito por (BRAND *et al.*, 1995), que se fundamenta en usar el reactivo 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) como indicador para medir la capacidad de secuestro de compuestos con propiedades antioxidantes presentes en la muestra. El principio del método DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuestos fenólicos) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazine y una especie radical

3.4.4. Determinación del coeficiente inhibición (IC_{50}) radical peroxilo

Se usó el método de TRAP (poder total de actividad reductora) reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2001).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Acondicionamiento de la materia prima

Los granos de cacao fueron secados en estufa a 45°C/4 horas hasta uniformizar la humedad (7,5%). Todas las muestras fueron envasadas en empaques trilaminadas y almacenadas hasta su análisis.

3.5.2. Preparación de extractos

Las operaciones realizadas para la preparación del extracto para cuantificación de polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante se muestran en la Figura 4.

- **Descascarillado**

Los granos de cacao fueron descascarillados de forma manual, para obtener la almendra.

- **Molido**

Ésta operación tiene por finalidad de reducir el tamaño de partícula para facilitar el proceso de desengrasado, la misma que se hizo con un mortero.

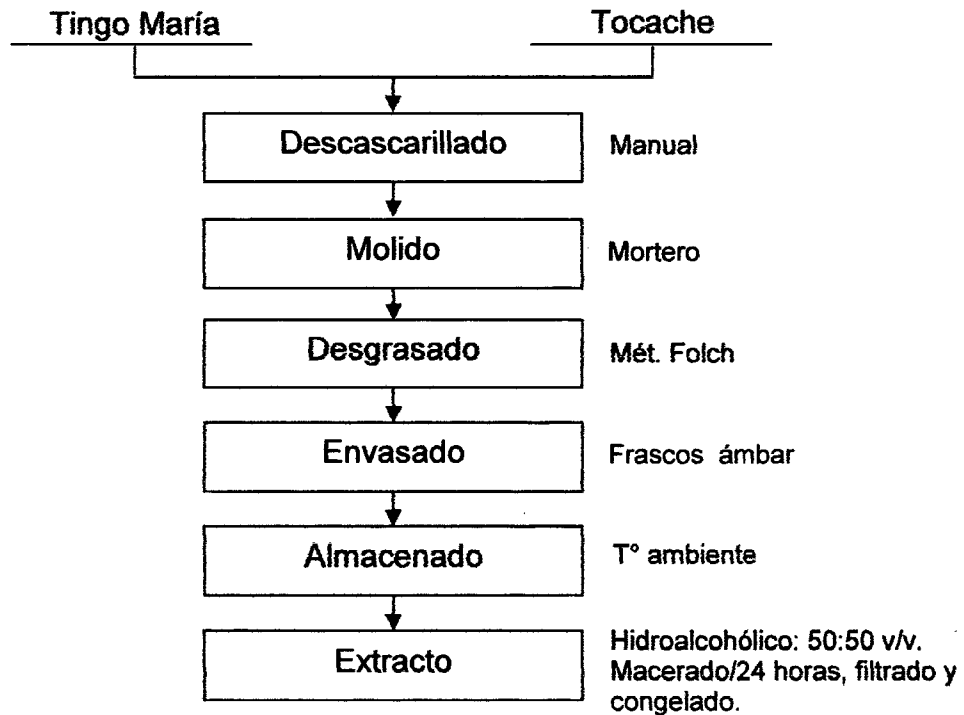


Figura 4. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.

- **Desgrasado**

El desgrasado se realizó por solvente en frío (Método Folch), que consistió en pesar 20g de muestra de cacao molido y macerado por 24 h en 50 mL de solvente (1:2 v/v. metanol y cloroformo), luego se filtró para separar la torta de la grasa; la torta fue secado en estufa a 45°C/15 min para evaporar el solvente.

- **Envasado**

Las muestras de cacao desgrasado fueron envasadas en frascos de vidrio de color ámbar.

- **Almacenado**

Los frascos de vidrio conteniendo las muestras de cacao desengrasadas fueron almacenados a temperatura ambiente hasta su análisis.

- **Extracto**

Se preparó un extracto hidroalcohólico de cacao a una concentración de 100 mg/mL para ello se pesó 10g de muestra desgrasada, se transfirió a un frasco de vidrio de color ámbar, luego se adicionó 100 mL de solución hidroalcohólica (50:50 v/v), se tapó herméticamente y se maceró por 24 h, se filtró y se almacenó en frascos de color ámbar y se colocó en congelación.

3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache

3.5.3.1. Determinación de la curva estándar

La curva estándar se realizó preparando una solución stock de 10

mL de ácido gálico a una concentración de 2 mg/mL a partir de ello se hicieron las diluciones siguientes: 1; 0,50; 0,25; 0,125 y 0,0625 mg/mL, con cinco repeticiones. Se agregó a cada tubo 1580 μ L de agua desionizada y 20 μ L de muestra a los estándares y para el control se adicionó 20 μ L de agua desionizada; se homogenizaron ligeramente. Luego se agregó 100 μ L del reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu a cada muestra, control y estándares, se mantuvo a temperatura ambiente por 1 min; se neutralizó la reacción agregando 300 μ L de Na_2CO_3 al 20% y finalmente se almacenó a temperatura ambiente durante 2 h a, para una completa reacción. Luego se realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm. Con los resultados obtenidos se graficó concentración vs absorvancia, se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

3.5.3.2. Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación de polifenoles totales se utilizó extracto hidroalcohólico 100 mg/mL y se siguió el procedimiento mostrado en la Figura 5, a partir de ello se adicionó a cada tubo 1580 μ L de agua destilada, 20 μ L de extracto diluido (12 mg/mL), 100 μ L de fenol de Folin-Ciocalteu y finalmente 300 μ L Na_2CO_3 al 20% y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h, luego se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700 nm. Las absorvancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en equivalente de ácido gálico (g EAG/100g muestra).

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al

azar (DCA) con arreglo factorial $2 \times 4 \times 2$ (DE MENDIBURU, 2007) y en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se procedió a determinar la prueba de Tukey $p < 0,05$ para ello se utilizó el programa SAS versión 9.0 (Español).

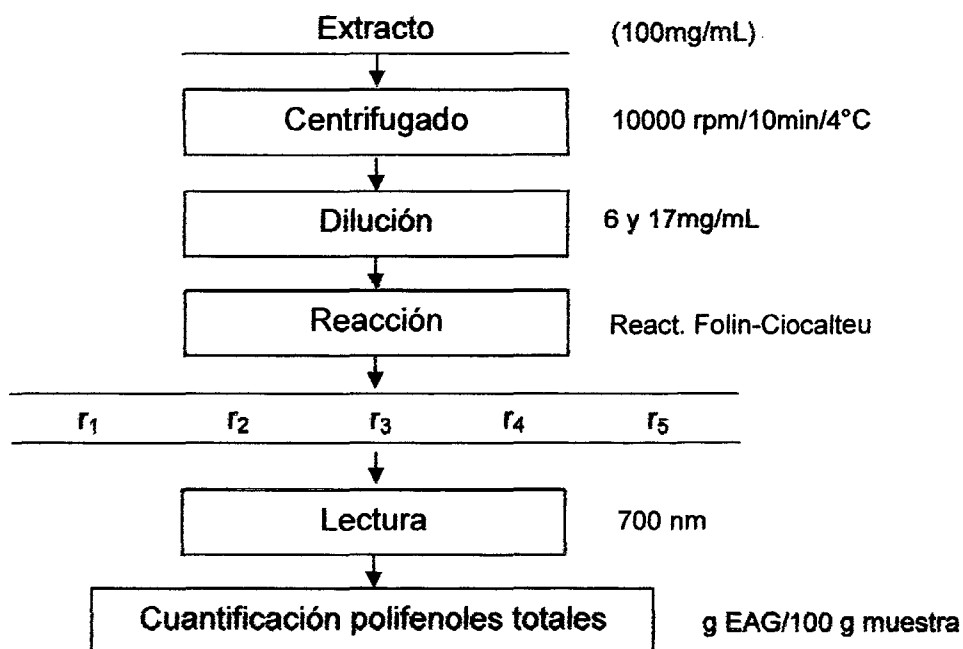


Figura 5. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en dos calidades de grano de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

3.5.4. Cuantificación de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache

- **Preparación de la solución Buffer**

Se prepararon dos soluciones buffer:

Buffer pH = 1: 125 mL de 0,2 M KCl y 375 mL de 0,2 M HCl y aforado a 1 L con agua desionizada.

Buffer pH = 4,5: 200 mL de 1 M CH_3COONa , 120 mL de 1 M HCl y 180 mL de

H₂O desionizada y aforado a 1 L.

- **Procedimiento de análisis**

Para la cuantificación de antocianinas se partió del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL, tal como se muestra en la Figura 6, en una cubeta de poliestireno se adicionó 60 µL de extracto y 940 µL de buffer para ambos pH (1 y 4,5); para los tratamientos que no alcanzaron las absorvancias requeridas se adicionó 170 µL de extracto y 830 µL de buffer y para el control se adicionó 500 µL de buffer y 500 µL de solución hidroalcohólica (50:50 v/v) y se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 510 nm. Las absorvancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación y expresadas en mg cianidina-3-glucósido/g muestra.

$$C(mg/g) = (A_{pH=1,0} - A_{pH=4,5}) * 482,82(1000/24825) * DF$$

Donde:

$C(mg/g)$ = mg de cianidina-3-glucósido por g de muestra seca.

PM = La masa molecular de la cianidina-3-glucósido es **484,82**.

AbM = La absortividad molar a 510 nm, a pH = 1,0; pH = 4,5 es la corrección de la formación de productos de degradación es **24825**

DF = Factor de dilución.

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial 2*4*2 (DE MENDIBURU, 2007), en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se procedió a determinar la prueba de Tukey $p < 0,05$ mediante el programa SAS versión 9.0 (Español). Toda la distribución de los tratamientos se presenta en la Figura 9.

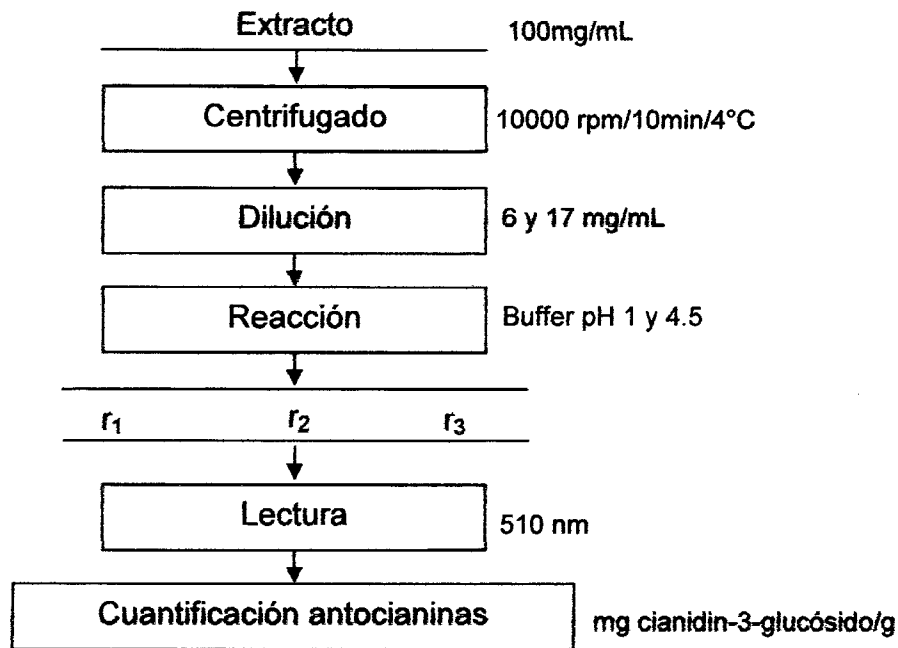


Figura 6. Diseño experimental para la cuantificación de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

3.5.5. Determinación de la capacidad antioxidante en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache

Para la evaluación de la capacidad antioxidante se realizó las siguientes pruebas:

3.5.5.1 Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH)

Para la determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical DPPH el procedimiento se presenta en la Figura 7. Para ello se preparó 10 mL de solución stock de DPPH a 1mM en metanol al 99% de pureza, se agitó hasta la solubilización completa del compuesto y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de ésta solución stock se preparó 40 mL de DPPH a 100 μ M

en metanol al 99% de pureza. El coeficiente de inhibición (IC_{50}) indica la cantidad de extracto de cacao mg/mL, requerido para inhibir el 50% del radical libre DPPH.

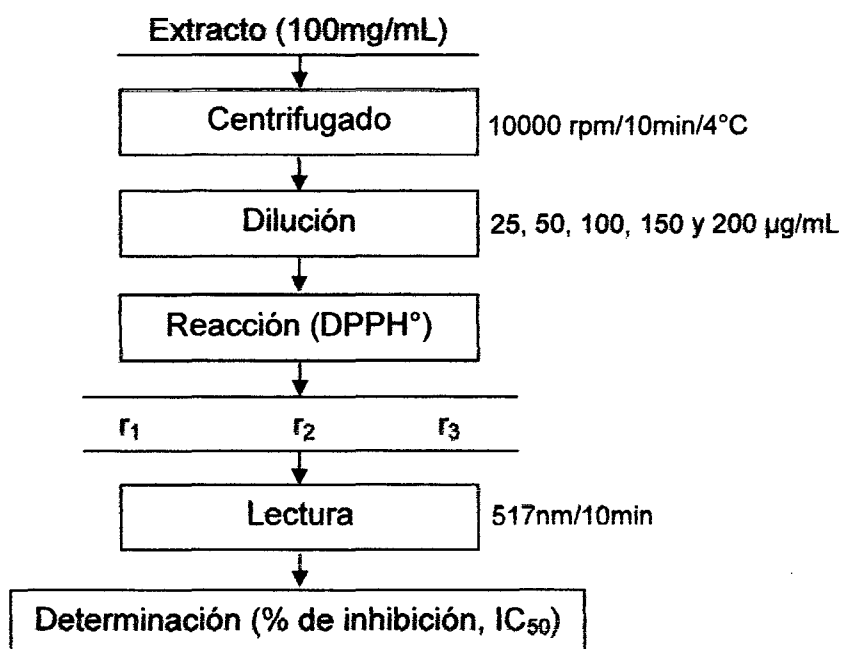


Figura 7. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad antioxidante en dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

A partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL, tal como se describe en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Preparación de soluciones de trabajo.

Solución de trabajo (µg/mL)	Extracto 100 mg/mL (µL)	Solución hidroalcohólica (µL)	Volumen final (µL)
25	10	990	1000
50	20	980	1000
100	40	960	1000
150	60	940	1000
200	80	920	1000

En una cubeta de poliestireno se adicionó 25 µL del volumen final de la solución de trabajo y 975 µL de solución DPPH a 100 µM, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 517 nm con intervalos de 30 s por un tiempo de 10 min. Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición DPPH} = \left[\frac{(\text{AbsControl} - \text{AbsMuestra})}{\text{AbsControl}} \right] \times 100$$

Dónde: Abs Control: Absorbancia del control

Abs Muestra: Absorbancia de la muestra en 10 min.

El diseño experimental de trabajo se presenta en la Figura 9, los resultados de la capacidad de inhibir (IC₅₀) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2*4*2 (DE MENDIBURU, 2007) y en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey p<0,05, mediante el programa SAS versión 9.0 (Español).

3.5.5.2 Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical peroxilo

Se evaluó mediante el método de TRAP (poder total de actividad reductora) reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2001), se preparó las siguientes soluciones stock en agua destilada desionizada; 100 mL de ABTS a 2,25 mM, 100 mL ABAP a 20 mM y 1 L de solución buffer fosfato a pH 7,4 (PBS) con cloruro de sodio (NaCl) a 154 mM, fosfato de sodio heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) a 2,7 mM y fosfato de potasio (KH_2PO_4) a 1,5 mM. La preparación de radical peroxilo consistió en mezclar 10 mL de solución de ABTS, 10 mL ABAP y 80 mL de PBS (pH 7,4), se colocó en baño maría a 70°C por 16 min y se dejó enfriar en hielo durante 30 min. Para la inhibición del radical peroxilo en granos de cacao comercial el procedimiento se muestra en la Figura 8, a partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 5, 10, 15 y 20 µg/mL. En el Cuadro 6 se detalla las operaciones para la preparación de la solución de trabajo.

En una cubeta de poliestireno se adicionó 10 µL de la solución de trabajo y 990 µL de solución peroxilo, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 414 nm con intervalos de 30 s por un tiempo de 10 min.

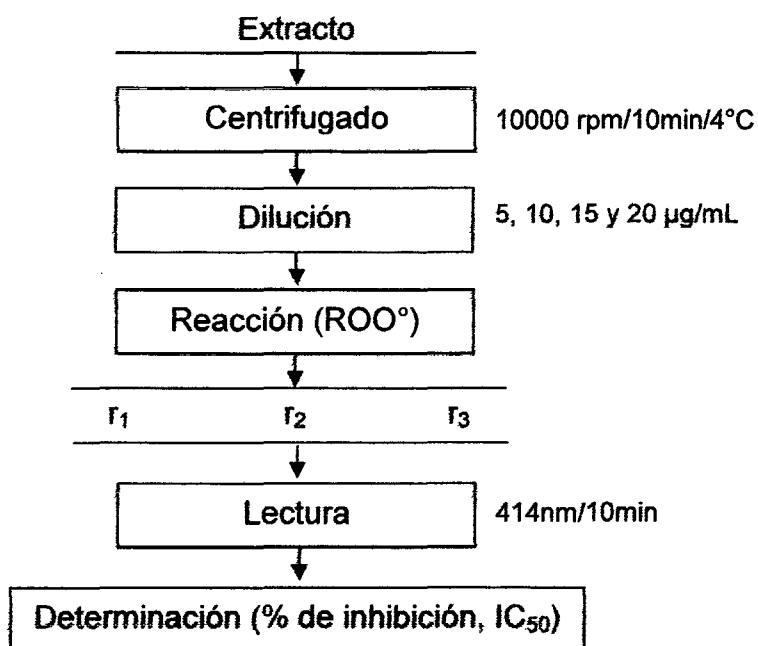


Figura 8. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad antioxidante en dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

Cuadro 6. Preparación de soluciones de trabajo en dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

Solución de trabajo (µg/mL)	Extracto 100mg/mL (µL)	Solución hidrolcólica (µL)	Volumen final (µL)
0,5	5	995	1000
1	10	990	1000
1,5	15	985	1000
2	20	980	1000

Para la determinación del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

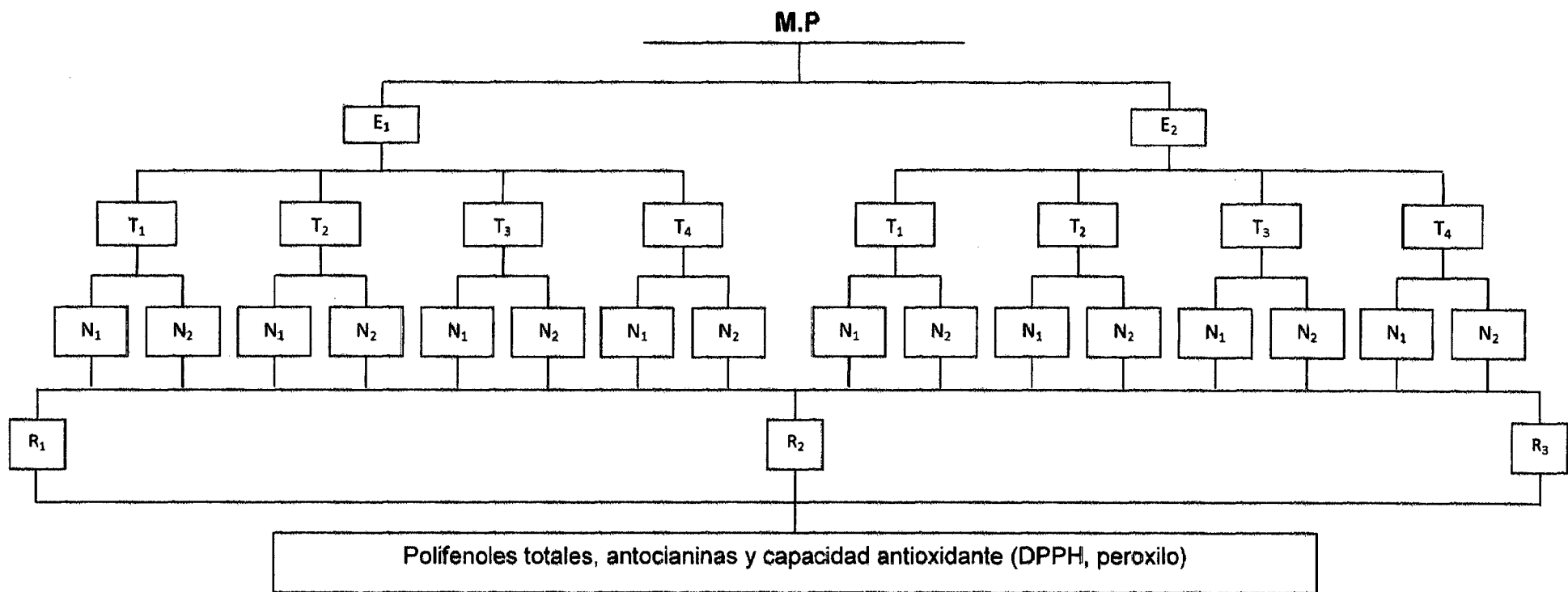
$$\%Inhibicion\ Peroxilo = \left[\frac{(AbsControl - AbsMuestra)}{AbsControl} \right] \times 100$$

Donde: Abs Control: Absorvancia del control

Abs Muestra: Absorvancia de la muestra en 10 min.

Los resultados de la capacidad de inhibición (IC₅₀) del radical peroxilo se determinó en cada uno de los tratamientos (Figura 9), el cual nos indica la cantidad de extracto hidroalcohólico de cacao (µg/mL) necesarios para inhibir el 50% del radical peroxilo, la misma que se analizó mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2*4*2 para lo cual se empleará el siguiente modelo matemático (DE MENDIBURU, 2007) Para los niveles donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey p<0,05, mediante el programa SAS versión 9.0 (Español).

Para analizar todos los tratamientos de manera conjunta se utilizó el análisis multivariado con componentes principales, utilizando el programa diseño InfoStat versión 2011.



Donde:

M.P

= Materia prima (granos de cacao)

N₁

= Grano bueno

E₁,

= Tingo María,

N₂

= Grano defectuoso

E₂,

= Tocache

T₁, T₂, T₃, T₄ = Casas comerciales

R₁, R₂, R₃ = Repeticiones

Figura 9. Diseño Experimental para la evaluación de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache

4.1.1 Determinación de la curva estándar

Para la cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de cacao comercial de Tingo María y Tocache fue necesario establecer una curva patrón y se elaboró en base al ácido gálico. Las diluciones estuvieron comprendidas entre 1 a 0,0625 mg/mL, los resultados se presentan en el Cuadro 7, con los valores encontrados se procedió a realizar la curva estándar la cual se presenta en la Figura 10.

Cuadro 7. Resultados de las absorvancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g).

Concentraciones (mg AG/mL)	Absorvancias (700nm)					Promedio
	r1	r2	r3	r4	r5	
1,000	0,941	0,915	1,100	1,127	1,110	1,039
0,500	0,463	0,511	0,486	0,506	0,506	0,494
0,250	0,244	0,255	0,255	0,253	0,260	0,253
0,125	0,118	0,142	0,128	0,123	0,140	0,130
0,063	0,067	0,065	0,060	0,066	0,056	0,063

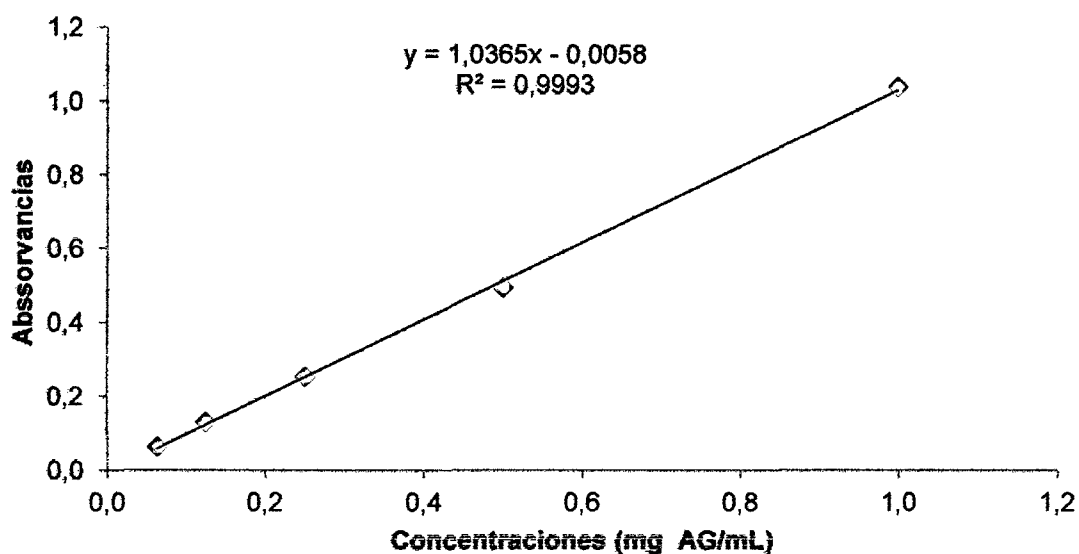


Figura 10. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.

Para una curva estándar se debe utilizar compuestos puros y recomendados por los protocolos de análisis, en este caso se trabajó con ácido gálico recomendado por (SANDOVAL *et al.*, 2001). Según BADUI (1988), indica que el ácido gálico tiene una fórmula $C_7H_6O_5$, PM 170,12. Por otro lado, ANDREW *et al.* (1989), indican que el método de Folin-Ciocalteu permite medir fenoles totales y para la cuantificación debe crearse la curva de calibración y puede realizarse con ácido gálico (GAE), porque este es un compuesto estable y pierde solo 5% de su valor real después de dos semanas de refrigerado y tapado.

Según los resultados la gráfica de la ecuación encontrada es de primer orden teniendo como variables "y" (absorvancia) y "x" (concentración, al respecto CORDOVA (2003) indica que la forma de estudio de la asociación entre las variables "x" e "y" es la regresión, que consiste en determinar una

relación funcional (recta de regresión) entre ellas, con el fin de que se pueda predecir el valor de una variable en base a la otra. El valor de $R=0,9993$ indica que existe una relación positiva muy fuerte o casi perfecta esto concuerda con lo mencionado por (HERNANDEZ *et al.*, 2001), quienes indican que valores cercanos a 1 se considera ajustes casi perfectos.

4.1.2 Cuantificación de polifenoles totales

Como sabemos los granos de cacao son la principal materia para la elaboración de chocolates que son muy consumido a nivel del mundo, así mismo se ha demostrado que los polifenoles cumplen una función porque son considerados como los responsables para explicar el mecanismo de su efecto antioxidante.

La cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache se presenta en el Cuadro 8 y Figura 11, los resultados fueron expresados en equivalente de ácido gálico (EAG).

Los resultados de la cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao comercial procedentes de la zona de Tingo María y Tocache en función a la calidad de los granos buenos y defectuosos se encontraron que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos (A-I).

El contenido de polifenoles totales de granos comerciales buenos procedentes de Tingo María y Tocache presentaron diferencia estadística significativa (A-II), comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) podemos indicar que el mayor contenido de polifenoles correspondió a

granos de TMD (Tingo María) $6,220 \pm 0,08$ g EAG/100g y TS (Tocache) $6,356 \pm 0,05$ g EAG/100 g y el menor contenido se encontró en TR (Tocache) $4,150 \pm 0,07$ g EAG/100 g, como podemos apreciar existe una variación entre los 8 tratamientos.

Cuadro 8. Cuantificación de polifenoles totales en dos calidades de grano de cacao comerciales de Tingo María y Tocache.

Lugar	Casas comerciales	Tratamientos	Grano bueno (g EAG/100 g)	Grano defectuoso (g EAG/100 g)
TingoMaría	Koki	TMK	$5,491 \pm 0,10$ ^c	$5,450 \pm 0,10$ ^a
TingoMaría	Gladys	TMG	$6,104 \pm 0,08$ ^{ab}	$4,665 \pm 0,08$ ^{bc}
TingoMaría	Durand	TMD	$6,220 \pm 0,08$ ^a	$4,645 \pm 0,03$ ^{bc}
TingoMaría	Sayco	TMS	$4,667 \pm 0,08$ ^d	$4,873 \pm 0,04$ ^b
Tocache	Amazónica	TA	$5,671 \pm 0,13$ ^{bc}	$4,762 \pm 0,09$ ^b
Tocache	Exp.Romex	TR	$4,150 \pm 0,07$ ^e	$4,339 \pm 0,15$ ^c
Tocache	Alto Huallaga	TH	$4,646 \pm 0,15$ ^d	$4,546 \pm 0,02$ ^{bc}
Tocache	Sulca	TS	$6,356 \pm 0,05$ ^a	$5,489 \pm 0,01$ ^a

Los valores representan (promedio \pm SEM) datos provienen del experimento (n=5) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos ($p \leq 0,05$).

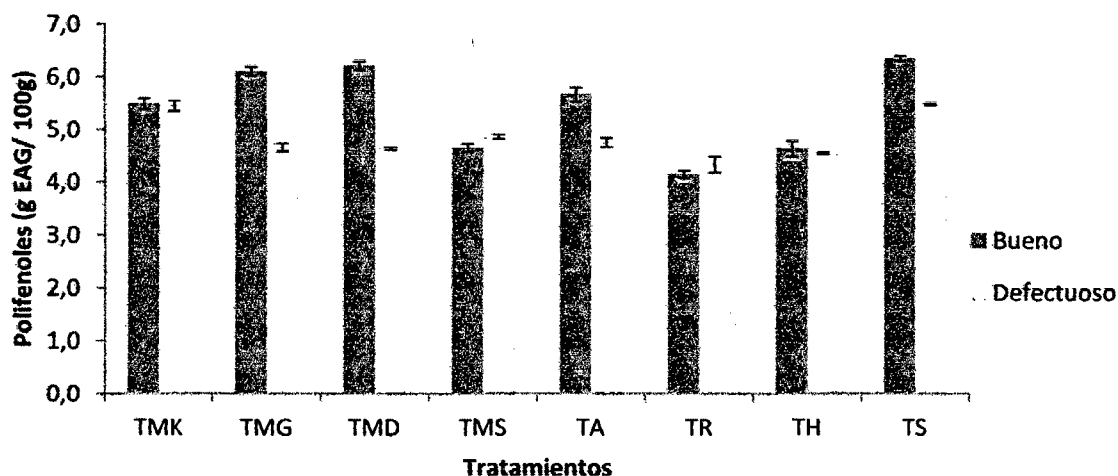


Figura 11. Representación del contenido de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

Esto puede deberse a que lo reportado por STAHL *et al.* (2009), quienes indican que el contenido de polifenoles en granos de cacao depende de algunos factores que influyen a la variedad, manejo poscosecha, fermentación, secado y tostado.

Así mismo en los granos de cacao comercial buenos fueron aquellos que se seleccionaron en función al tamaño, color, forma y aroma que indican una buena calidad y el mayor contenido polifenoles totales se encontró en el tratamiento TS (Tocache) $6,356 \pm 0,05$ g EAG/100 g. Según TOMAS *et al.* (2007), manifiestan que el contenido de polifenoles totales en granos de cacao no fermentados y secados de diferentes países es variable, Costa de Marfil variedad Forastero $8,15 \pm 1,82$ g EAG/100g, Colombia variedad Amazon $8,14 \pm 0,37$ g EAG/100g, Ecuador variedad Amazon, Trinitario, Canelo y Amazon

híbrido $8,42 \pm 0,87$ g EAG/100 g, Venezuela variedad Trinitario $6,43 \pm 0,56$ g EAG/100 g, y Perú variedad Criollo 5 g EAG/100 g, comparando estos resultados con los de la investigación podemos indicar que estamos dentro del rango reportado. HUANCA (2010), en su trabajo respecto a la cuantificación de polifenoles en cacao criollo reportó $7,597 \pm 0,011$ g EAG/100 g y en y CCN-51, $7,547 \pm 0,038$ g EAG/100 g en granos de cacao fermentado y secado, esto se debe a que durante la fermentación los polifenoles están sujetos a modificaciones bioquímicas por polimerización y forman un complejo con proteínas lo que genera un decrecimiento de la solubilidad y la astringencia.

Con respecto a los granos comerciales defectuosos presentado en el Cuadro 8 y la Figura 11, podemos indicar que entre los tratamientos existió diferencia estadística significativa (A-III) comparando los promedios se puede entender que entre los factores el contenido total de polifenoles fue variable, el mayor contenido se determinó en los tratamientos TS (Tocache) $5,489 \pm 0,01$ g EAG/100g, y TMK (Tingo María) $5,450 \pm 0,01$ g EAG/100 g y el menor contenido se reportó en TR (Tocache) $4,339 \pm 0,15$ g EAG/100 g; al respecto podemos indicar que los defectos de granos considerados fueron (grano mohoso, pizarroso, infestado, germinado, plano, violáceo, múltiple, atrofiado y partido); que comercialmente no tienen valor, estos granos se presentan de manera cotidiana en un muestreo y son descartados, pero el contenido de polifenoles totales no se ve afectado significativamente; según NIEMENAK *et al.* (2006), existen factores internos y externos que afectan la cantidad y/o calidad de los compuestos polifenólicos incluyendo la genética (variedad y regional) condiciones medio ambientales, (condiciones de crecimiento tales como:

intensidad luminosa, humedad, luminosa, temperatura, uso de fertilizantes y otros factores estresantes), de manera general podemos indicar que los granos buenos de cacao comerciales de la zona de Tingo María y Tocache presentan mayor cantidad de polifenoles totales, pero el rango total de polifenoles de granos buenos y defectuosos fue 6,356 g EAG/100 g a 4,150 g EAG/100g.

PADILLA *et al.* (2008), indican en su investigación de evaluación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas de *Theobroma cacao* L. fue $6,66 \pm 0,044$ g EAG/100 g. JONFIA *et al.* (2007), en un estudio referido al contenido de polifenoles totales en 4 híbridos de cacao reportaron 7 a 8 g EAG/100 g, y determino que no existe diferencia significativa cuando comparo con un grano tradicional (finca tradicional); JU y HOWARD (2005), reportaron en cascara de uva de 3,2 a 6,2 g EAG/100 g.

4.2. Cuantificación de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache

Las antocianinas son compuestos del grupo de los flavonoides que se caracteriza por su alto poder reductor, son los responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta a frutos y flores, en los granos de cacao comerciales analizando el contenido de antocianinas entre centro de acopio, casa comercial y la calidad de grano encontramos que existe diferencia significativa entre los tratamientos (A–IV).

Según los resultados de antocianinas en granos buenos de cacao presentada en el cuadro 9 y figura 12 encontramos que entre los tratamientos existe diferencia estadística significativa (A–V), comparando los promedios se

tienen que el mayor contenido de antocianinas correspondió al tratamiento TMD $12,209\pm 0,20$ mg cianidina-3-glucósido/g y el menor al tratamiento TH $2,132\pm 0,02$ mg cianidina-3-glucósido/g, como podemos apreciar existe una gran variación del contenido de antocianinas, esto permite dilucidar la calidad de fermentación que ha sufrido el grano. Al respecto CUBERO *et al.* (1990), indican que el contenido de antocianinas permite separar mejor aquel cacao bien fermentado de aquel sin fermentar. Así mismo ROHSIUS (2006) y DEL VALLE *et al.* (2005), reportan que durante la fermentación se da el cambio de color del cotiledón que pasa de violeta a marrón por la liberación de antocianinos de las vacuolas que son el lugar de almacenamiento a las capas hipodérmicas de las bayas después de tres a cuatro días de fermentación y en algunos casos en el mesocarpio y las semillas.

Los resultados fueron expresados en cianidina-3-glucósido según WINKEL (2001), reportan que la cianidina-3-glucósido da el mayor poder radical lo que confiere la mayor capacidad antioxidante. Así mismo DEL VALLE *et al.* (2005), indica que las seis antocianinas más comunes en los vegetales superiores son: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delfinidina (Df), y en frutas se encuentra principalmente (Cy) 50% el tipo de glucosilación más frecuente son: 3-monósidos; 3-biósidios; 3,5-diglicósidos y 3,7-diglicósidos.

En los granos defectuosos (Cuadro 9 y Figura 12) según el análisis estadístico también se encontró que entre los tratamientos existió diferencia significativa (A–VI), comparando entre tratamientos estos fluctuaron entre TMD ($11,410\pm 0,18$ mg cianidina-3-glucósido/g y TMS $1,728\pm 0,10$ mg cianidina-3-

glucósido/g), como podemos apreciar en los granos defectuosos y granos buenos también existió una gran variación en el contenido de antocianinas.

Cuadro 9. Cuantificación de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

Lugar	Casas comerciales	Tratamiento	Granos buenos (mg cianidina-3-glucósido/g)	Granos defect. (mg cianidina-3-glucósido/g)
Tingo María	Koki	TMK	9,768±0,09 ^c	9,487±0,12 ^b
Tingo María	Gladys	TMG	10,589±0,21 ^b	7,520±0,29 ^c
Tingo María	Durand	TMD	12,209±0,20 ^a	11,410 ±0,18 ^a
Tingo María	Sayco	TMS	2,700±0,12 ^{de}	1,728±0,10 ^f
Tocache	Amazónica	TA	2,159±0,14 ^{de}	2,475±0,07 ^e
Tocache	Exp. Romex	TR	2,761±0,04 ^d	3,261±0,05 ^d
Tocache	Alto Huallaga	TH	2,132±0,02 ^e	2,368±0,06 ^{ef}
Tocache	Sulca	TS	2,776±0,03 ^d	2,464±0,06 ^e

Los valores representan (promedio±SEM) datos provienen del experimento (n=3) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos ($p \leq 0,05$).

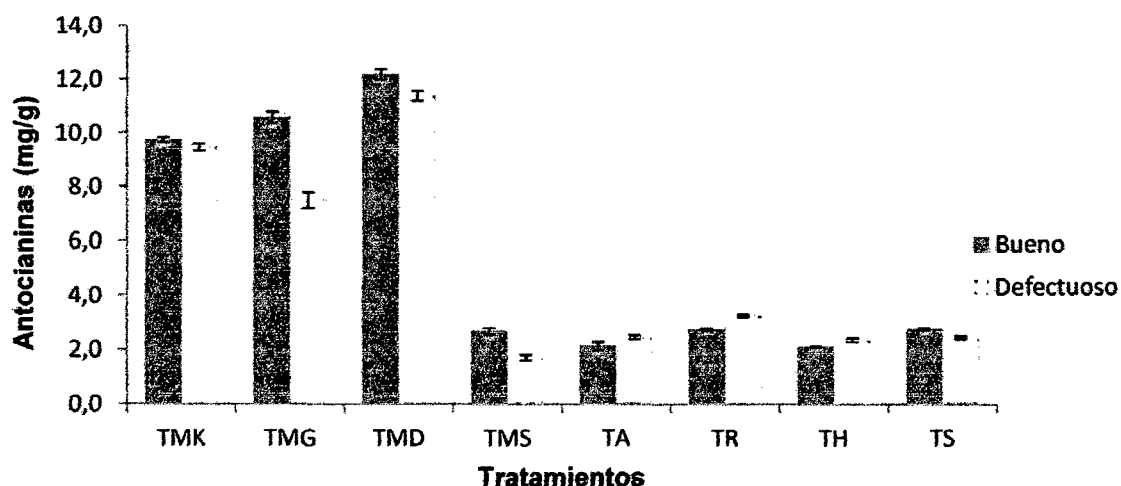


Figura 12. Representación del contenido de antocianinas en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

Según LOPEZ *et al.* (2003), reporta que durante la fermentación sucede la oxidación de las antocianinas y complejos de aminoácidos con compuestos fenólicos formando quinonas, estas contribuyen disminuyendo el amargor y astringencia de las almendras.

Los granos frescos de cacao contienen pigmentos de antocianinas de color púrpura, cianidins 3- β galactosyl y cianidins 3- α -L-arabinosyl y durante la fermentación estos pigmentos son hidrolizados por glucósidos resultando un cambio del cotiledón de violeta a marrón (NIEMENAK *et al.*, 2006).

Comparando el contenido de antocianinas de diferente lugar de acopio, centros comerciales y calidad de grano el rango fluctúa entre 1,727 mg cianidina-3-glucósido/g (calidad defectuoso) y 12,209 mg cianidina-3-glucósido/g (calidad bueno).

Según CUBERO (1990), reportó sobre el proceso de fermentación en granos sin fermentar 12 mg/g y 1,72 mg/g en almendras fermentadas, según la información reportada, podemos decir que las antocianinas se degradan durante el proceso de fermentación, incluso en granos seleccionados de buena calidad se encontró alto nivel de antocianinas, además en los centros de acopio de la investigación no se considera las variables de calidad para establecer el precio.

AWIKA *et al.* (2004), reporta que el mayor contenido de antocianinas correspondió a frijol sorgo negro 4,0-98 mg/g y el menor para el color rojo 0,3-0,9 mg/g. JU y HOWARD (2005), indican en cascara de uva reporta en extracto acuoso 21,5 mg de monoglucósido/g de peso seco y en extracto metanólico 50,2 mg monoglucósido/g de peso seco.

4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache

4.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH)

La propiedad antioxidante del cacao ha sido grandemente estudiado en los últimos años incluyendo también la caracterización fitoquímica y su propiedad antioxidante (inhibición de radicales libres, DPPH y ABTS).

Los resultados del coeficiente de inhibición (IC_{50} radical 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazyl (DPPH) en granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache en dos calidades presentaron diferencia estadística significativa (A–VII).

En el Cuadro 10 y Figura 13 se presentan los resultados del DPPH de los granos buenos acopiados en Tingo María y Tocache según el análisis estadístico estos presentaron diferencia significativa (A–VII), comparando los promedios tenemos que la mayor capacidad antioxidante lo presentaron los tratamientos TMG IC_{50} $51,648 \pm 0,50$ $\mu\text{g/mL}$ y el tratamiento TMD IC_{50} $51,310 \pm 0,47$ $\mu\text{g/mL}$ y la menor cantidad lo presentó el tratamiento TH IC_{50} $80,887 \pm 0,62$ $\mu\text{g/mL}$.

JONFIA *et al.* (2007), indican que los polifenoles y la capacidad antioxidante de granos de cacao a diferentes regiones incluyendo Ghana demostró que afecta significativamente la región geográfica. EL KAR *et al.* (2011), indican que la actividad antioxidante depende de los metabolitos secundarios que produce la planta.

Cuadro 10. Capacidad antioxidante referida al radical DPPH en dos calidades de granos de cacao comercial Tingo María y Tocache.

Lugar	Casas comerciales	Tratamiento	Granos buenos IC ₅₀ (µg/mL)	Granos defectuosos IC ₅₀ (µg/mL)
Tingo María	Koki	TMK	60,296±0,66 ^d	63,807±0,41 ^d
Tingo María	Gladys	TMG	51,648±0,50 ^f	58,420±0,64 ^e
Tingo María	Durand	TMD	51,310±0,47 ^f	62,492 ±0,66 ^d
Tingo María	Sayco	TMS	65,116±0,51 ^c	76,529±0,66 ^b
Tocache	Amazónica	TA	58,108±0,63 ^d	67,103±0,34 ^c
Tocache	Exp. Romex	TR	73,216±0,56 ^b	83,774±0,33 ^a
Tocache	Alto Huallaga	TH	80,887±0,62 ^a	85,380±0,32 ^a
Tocache	Sullca	TS	55,236 ±0,61 ^e	59,514±0,74 ^e

Los valores representan (promedio ±SEM) datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

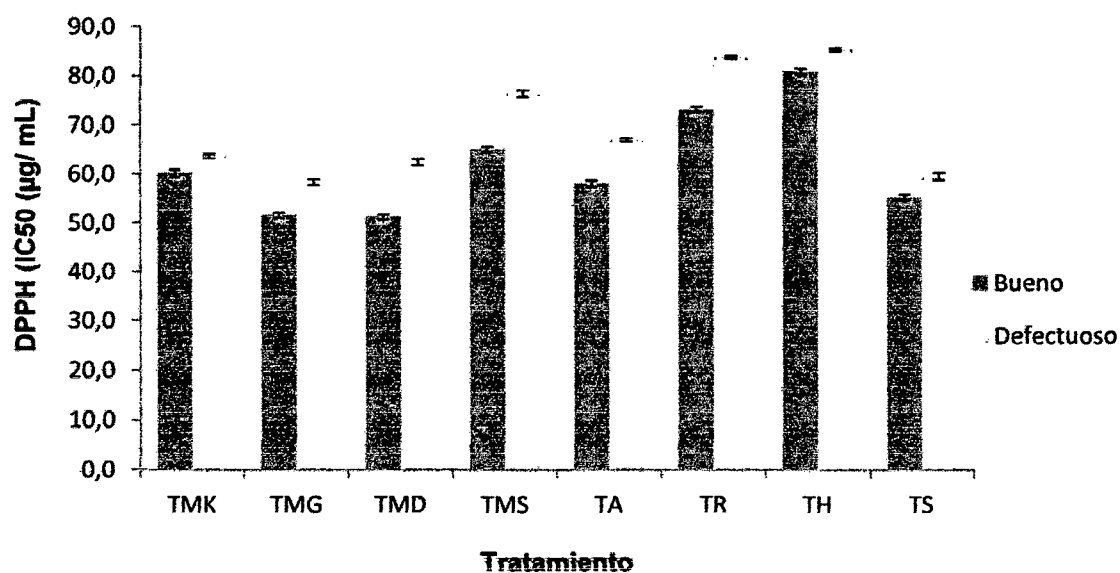


Figura 13. Comportamiento del IC₅₀ con el radical DPPH en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

Así mismo podemos indicar que la capacidad antioxidante de granos procedentes de Tingo María fluctúan IC_{50} 51 a 65 $\mu\text{g/mL}$ y los granos procedentes de Tocache IC_{50} 55 a 80 $\mu\text{g/mL}$.

En el Cuadro 10 y Figura 13 referido a los granos defectuosos podemos apreciar que existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos (A–IX) comparando los promedios podemos indicar que la mayor capacidad lo presentaron los tratamientos TMG IC_{50} $58,420 \pm 0,64$ $\mu\text{g/mL}$ y TS IC_{50} $59,514 \pm 0,14$ $\mu\text{g/mL}$ y la menor capacidad presentó los tratamientos TR IC_{50} $83,774 \pm 0,33$ $\mu\text{g/mL}$ y TH IC_{50} $85,380 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$. También podemos apreciar que los granos defectuosos tienen buena capacidad antioxidante; estos granos fueron considerados aquellos que tenían tamaño pequeño, atrofiados, partidos, múltiple, germinado y pizarroso, que básicamente son defectos físicos que permiten que pierdan la calidad. Como sabemos la capacidad antioxidante está dado por los polifenoles totales, monómero flavonol (epicatequina y catequina) y proantocianinas, estos compuestos son considerados como candidatos potenciales para combatir los radicales libres (AIKPOKPODION y DONGO, 2010). ISMAIL y LYE (2006), en su investigación referido al efecto antioxidante de cacao demostró que no existe diferencia significativa entre la actividad antioxidante de extracto de cáscara de cacao y combinación de cáscara y el cotiledón, comparando todos los tratamientos tanto granos procedentes de Tingo María y Tocache en las dos calidades podemos indicar que la mayor capacidad presentaron los granos TMG y TMD bueno y los que presentan la menor actividad fueron TR y TH defectuoso, esta variación puede deberse a lo reportado por ISMAIL y LYE (2006), quienes indican que la

actividad antioxidante de compuestos sintéticos es similar a la cáscara de cacao inhibiendo la oxidación lipídica en carne de res refrigerado por 14 días y esto puede deberse al efecto de los compuestos fenólicos.

JONFIA *et al.* (2007), respecto a la capacidad antioxidante mediante la prueba de FRAP de granos de cacao y encontró $12,4 \pm 7,3$ $\mu\text{mol TE/g}$ para la variedad tradicional y en los híbridos $45,5 \pm 2,86$ $\mu\text{mol TE/g}$ y presentan diferencia altamente significativa comparando con los granos tradicional.

La preparación del extracto y el tipo de solvente utilizado influye grandemente en la determinación de la actividad antioxidante según OTHMAN *et al.* (2007), indican que cada metabolito analizado tiene un comportamiento o solubilidad determinado, no todos se comportan igual, a decir, en un extracto de cacao tratados con metanol son solubles las xantinas (teobroma y cafeína), menos flavonoides y pigmentos que pueden influenciar en la capacidad antioxidante/antiradical.

En conclusión la mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH fue IC_{50} 51 $\mu\text{g/mL}$, HUANCA (2010), reportó en cacao criollo IC_{50} 43 $\mu\text{g/mL}$ y en CCN-51 IC_{50} 52 $\mu\text{g/mL}$; al respecto CIENFUEGOS *et al.* (2009), manifiestan que la actividad antioxidante varía según la variedad botánica, factores de manufactura, tales como manejo de poscosecha, fermentación, secado, tostado y tratamiento de alcalinización. El mismo cita que un 90% decae en la concentración de epicatequina después de la fermentación y secado, el decrecimiento significativo del contenido de flavonoides después del proceso de fermentación y tostado en granos de cacao secados al sol, también

decrecen 3 - 5 veces los niveles de procianidinas durante la fermentación.

NIEMENAK *et al.* (2006), indican que la actividad antioxidante, calidad y cantidad de los compuestos fenólicos es variable, obedece a la genética, diversidad del medio ambiente (microclimas), condiciones de crecimiento tales como la intensidad de luz, humedad, temperatura, uso de fertilizantes y factores de estrés. Los compuestos fenólicos encontrados en cacao de Camerún son diferentes a Ghana y Malasia.

4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical peroxilo.

El cacao y los derivados son productos muy consumidos en todo el mundo y grandemente estudiado por las propiedades antioxidantes y antiradical *in vitro* porque contienen (ácido fenólico, procyanidina, flavonoides). Por ello es reconocido como compuesto bio-activo, según los resultados de la cuantificación de peroxilo en granos de cacao de los centros de acopio Tingo María y las casas comerciales en las dos calidades de grano se encontraron que existió diferencia estadística significativa (A-X).

Cuadro 11. Capacidad antioxidante referida al radical peroxilo en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

Lugar	Casas comerciales	Tratamiento	Granos buenos IC ₅₀ (µg/mL)	Granos defectuosos IC ₅₀ (µg/mL)
Tingo María	Koki	TMK	9,567±0,10 ^d	10,193±0,06 ^d
Tingo María	Gladys	TMG	8,227±0,08 ^f	9,306±0,10 ^e
Tingo María	Durand	TMD	8,174±0,07 ^f	9,955 ±0,11 ^d
Tingo María	Sayco	TMS	10,373±0,08 ^c	12,191±0,11 ^b
Tocache	Amazónica	TA	9,520±0,08 ^d	11,231±0,06 ^c
Tocache	Exp. Romex	TR	12,254±0,09 ^b	14,021±0,06 ^a
Tocache	Alto Huallaga	TH	13,537±0,10 ^a	14,289±0,05 ^a
Tocache	Sulca	TS	9,112 ±0,05 ^e	9,916±0,11 ^d

Los valores representan (promedio ±SEM) datos provienen del experimento (n=9) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

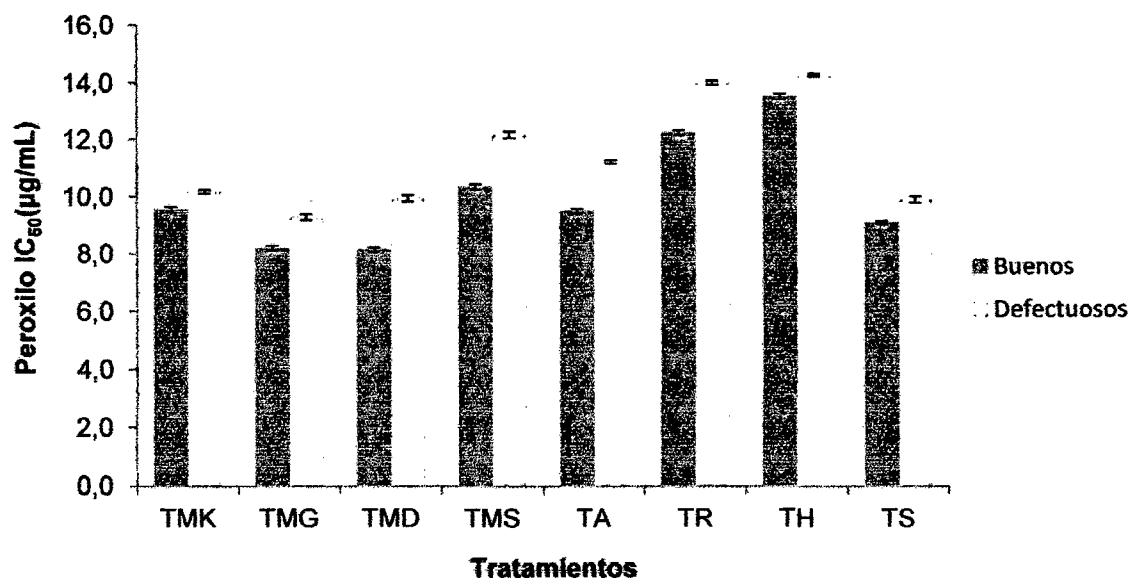


Figura 14. Comportamiento del IC₅₀ con el radical peroxilo en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

En el Cuadro 11 y Figura 14 se presentan los resultados referida al radical peroxilo en granos de cacao bueno encontramos que existe diferencia estadística significativa (A–XI) y según Tukey ($p < 0,05$) la mayor capacidad antioxidante del radical peroxilo se encontraron en los tratamientos TMG y TMD IC_{50} $8,227 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ y $8,174 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$, el tratamiento que tuvo la menor capacidad antioxidante fue TH IC_{50} $13,537 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, observando todas las muestras podemos indicar que el lugar de procedencia y la casa comercial no influyó en la capacidad antioxidante; entonces esta variación puede deberse a otros factores como la variedad, grado de fermentación tal como reportan OTHMAN *et al.* (2010), la capacidad antioxidante en dos medios de extracción diferentes (agua y etanol) muestran valores diferentes de la capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC) y el poder antioxidante de reducción de fierro (FRAP). El valor del TEAC fue de 34,9 a 43,9 μmol de TEAC/100 g de cacao en extracto etanólico y con agua fue 13,9 a 21,9 μmol de TEAC/100 g de muestra; además según las variedades de cacao Sulawesi > Malaysia = Ghana = Cote d' Ivoire (44, 38, 36, 35% y 22, 17, 15, 14%) para agua y extracto etanólico respectivamente. Así mismo, AIKPOKPODION (2010), indica que los polifenoles y la capacidad antioxidante se reducen durante la fermentación.

Del mismo cuadro considerando los granos de cacao defectuoso encontramos diferencia estadística (A–XII), y comparando los promedios la mayor capacidad se encontró en el tratamiento TMD IC_{50} $9,955 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ y TMG IC_{50} $9,306 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ como podemos apreciar en los granos defectuosos existió una buena capacidad antioxidante comparando todos los tratamientos considerando granos buenos y defectuosos se encontró que la

capacidad antioxidante varía entre IC_{50} $8,174 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$ a IC_{50} $14,289 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$. Comparando estos resultados con los reportados por HUANCA (2010), encontró un variación en cacao criollo IC_{50} $11,014 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ y cacao CCN-51 IC_{50} $9,146 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$.

Según el análisis de los resultados en granos buenos los tratamientos TMG y TMD obtuvieron el mayor contenido de antocianinas $10,589 \pm 0,21$ mg (cianidina-3-glucósido)/g y $12,209 \pm 0,20$ mg (cianidina-3-glucósido)/g, y el contenido de polifenoles fue $6,104 \pm 0,08$ g EAG/100 g y $6,220 \pm 0,08$ g EAG/100 g y la mejor capacidad antioxidante referido al radical peroxilo. Esto indica que los granos procedentes de estos tratamientos no fueron bien fermentados y la capacidad antioxidante mediante el radical peroxilo puede corresponder a las antocianinas más no a los polifenoles, según OTHMAN (2010), indica que el contenido de polifenoles puede variar por la variedad, el grado de fermentación y los parámetros de proceso. Así mismo AWIKA *et al.* (2004), indica que las antocianinas son colorantes pero además tienen actividad antioxidante. EL KAR (2011), el método de extracción utilizado en el experimento fue hidroalcohólico esto también pueden hacer variar los resultados; según SUN y HO (2005), muestran que el grado de actividad antioxidante y el contenido de polifenoles fue influenciado por el tipo de solvente en el extracto.

Según la correlación de Pearson (A–XIII) el DPPH con el peroxilo presentaron una correlación directa de 0,99 ($P \leq 0,001$), mediana correlación e inversa lo presentó los polifenoles totales con respecto a DPPH y peroxilo -0,78 y -0,76 ($P < 0,0001$). Según ALLAITH (2008), encontró baja y moderada

correlación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante. Las antocianinas con respecto al peroxilo presenta una correlación inversa $-0,61$ con una significancia de $(P \leq 0,001)$; no presentaron correlación los polifenoles y antocianinas. Según OTHMAN *et al.* 2010, en su estudio sobre la capacidad antioxidante en granos de cacao encontraron que la epicatequina es la responsable de la correlación con la actividad antioxidante y esta representa el 60% del total de los polifenoles y son monómeros de flavonol (epicatequina y catequina).

Según el análisis de componentes principales (A–XIV) considerando todos los granos de cacao acopiados en las ciudades de Tingo María y Tocache y las calidades de grano (bueno y defectuoso). Según el análisis de autovectores (Figura 15) CP1 los polifenoles y antocianinas son las variables que representa el 77,3% de la variabilidad total.

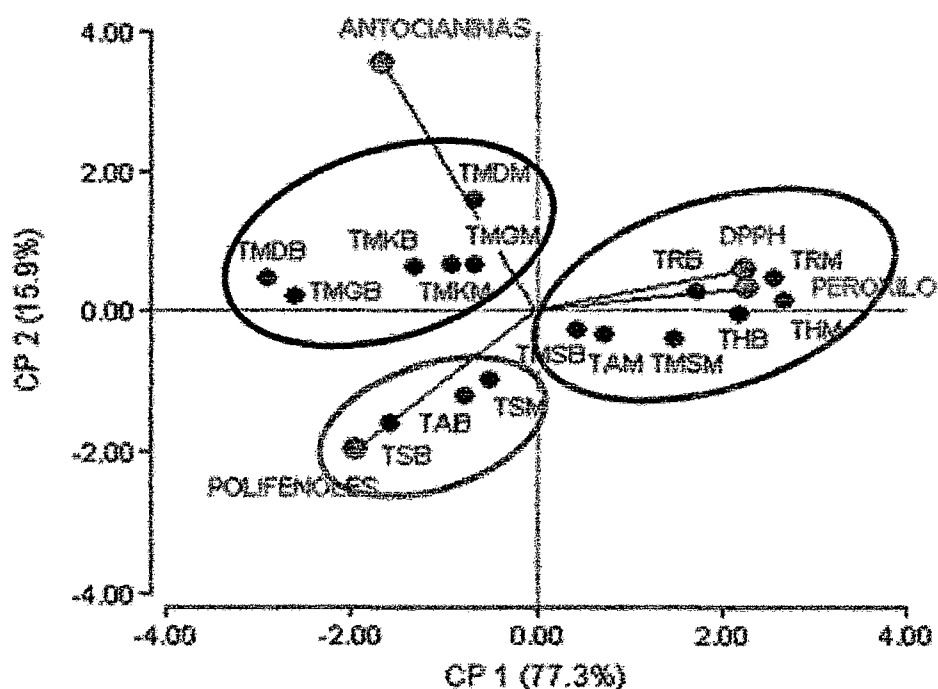


Figura 15. Análisis de autovectores.

La antocianina represento el 15,9% de la variabilidad del CP2 y juntos representa el 93,2%.

Según NIEMENAK *et al.* (2006), un componente principal en base a los clones estudiados, el primer compuesto principal CP1 los polifenoles totales, catequinas, epicatequinas y antocianinas representan una variabilidad de 58,60% del total y epicatequina representa el 21,60% de variabilidad del CP2 y la variabilidad total de los componentes principales representan el 93,76%.

Según el análisis de conglomerados (Figura 16) referente a las muestras evaluadas podemos diferenciar tres grupos, el grupo 1 representa el 19% (3 muestras) y están relacionadas a los polifenoles, el grupo 2 representa el 44% (7 muestras) y están muy relacionados al DPPH y peroxilo y el grupo 3 representa el 37% (6 muestras) y está muy relacionado a las antocianinas, esta alta asociación de muestras con las antocianinas indican pues que algunos granos no fueron bien fermentados. (AIKPOKPODION, 2010).

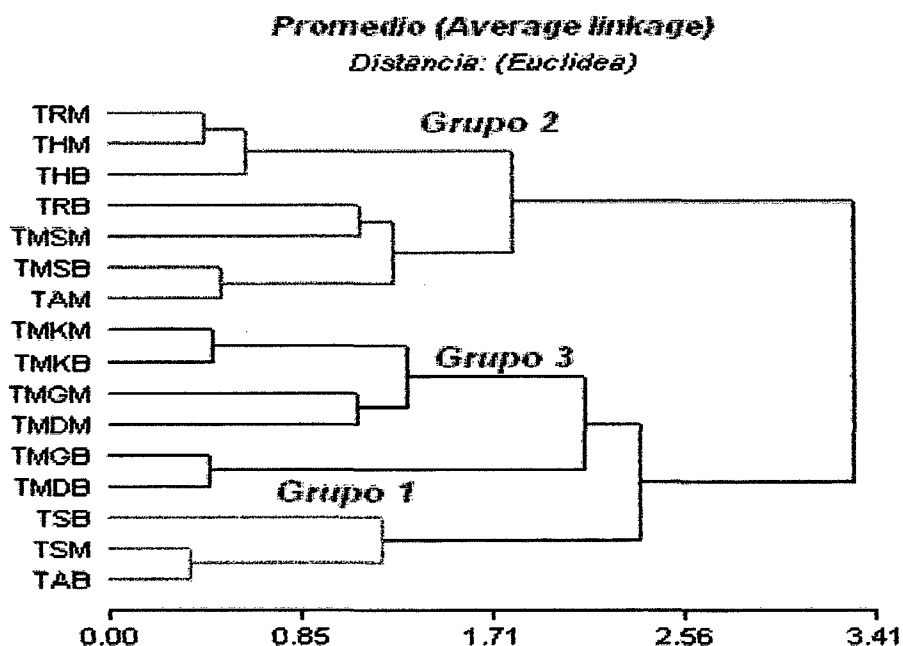


Figura 16. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de cacao.

Como sabemos las antocianinas tienen influencia en la actividad antioxidante tal como indica DEL VALLE (2005), las propiedades antioxidantes son moduladas por las diferentes hidroxilaciones y glucosilaciones y es la cianidina 3 - glucosido la antocianina con mayor poder antioxidante.

Un grano de cacao bien fermentado según ARLORIO *et al.* (2005), presenta la epicatequina y el ácido p-hidroxibenzoico (2753 y 2752) ppm respectivamente. De los análisis realizados podemos concluir que en la procedencia de granos de cacao, las casas comerciales no influyen en la actividad antioxidante pero sí la calidad (buenos o defectuosos).

V. CONCLUSIÓN

- Los contenidos de polifenoles totales en granos de cacao comerciales fueron de $4,150 \pm 0,07$ a $6,356 \pm 0,05$ g EAG/100g.
- Los contenidos de antocianinas en granos de cacao comerciales estuvieron entre $1,728 \pm 0,10$ a $12,209 \pm 0,20$ mg cianidina-3-glucósido/g
- La capacidad antioxidante frente al radical DPPH se encontró entre IC_{50} $51,310 \pm 0,47$ a $85,380 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$.
- La capacidad antioxidante frente al radical peroxilo fluctuaron ente IC_{50} $8,174 \pm 0,07$ a $14,289 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$.
- Los granos comerciales acopiados en Tingo María y Tocache no afectaron la capacidad antioxidante pero si influyó la calidad de grano, siendo mejor los granos bueno que los defectuosos.

VI. RECOMENDACIONES

Según los resultados obtenidos en el estudio, se recomienda lo siguiente:

- **Cuantificar el contenido de catequinas y epicatequinas y la correlación con la capacidad antioxidante en los granos de cacao.**
- **Evaluar la capacidad antioxidante, polifenoles totales y antocianinas en granos de cacao cosechados en diferentes épocas del año.**
- **Cuantificar los polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante en productos elaborados con granos de cacao.**
- **Evaluar la capacidad antioxidante y catequinas en productos comerciales de cacao.**
- **Evaluar el contenido de antocianinas en las diferentes etapas de beneficio.**
- **Estudiar los polifenoles totales, antocianinas, actividad antioxidante en cascara de cacao y su efecto en la conservación de carnes.**

ABSTRACT

This research work was developed in the laboratories (CIPNA – CIDBAM) – UNAS. The objectives were: quantify the total polyphenol content, anthocyanins and determine the antioxidant activity by its capacity to inhibit free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and peroxy in two grades of commercial cocoa beans (good and bad) of Tingo María and Tocache. The samples were ground and defatted by the method of Folch. Hydroalcoholic extract was prepared which consisted weigh 10g cocoa 100 mL (water/ethanol 50:50 v/ v), macerated for 24h, filtered and centrifuged at 10000 rpm/10min/4° C. The results were analyzed using completely randomized design (DCA) with factorial 2*4*2, in treatments where there was statistical difference was applied the Tukey test ($p < 0,05$), for this we used SAS version 9.0 (Spanish). To analyze all treatments together Multivariate analysis was used with principal components, for this analysis we used the statistical software version 2011 InfoStat. The contents of total polyphenols in commercial cocoa beans varied between $4,150 \pm 0,07$ to $6,356 \pm 0,05$ g EAG/100 g. The contents of anthocyanins in commercial cocoa beans were between $1,728 \pm 0,10$ at $12,209 \pm 0,20$ cyanidin-3-glucoside/g. With regard to antioxidant capacity against DPPH radical was found an IC_{50} of $51,310 \pm 0,47$ to $85,380 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$, and antioxidant capacity with peroxy radical fluctuated between IC_{50} $8,174 \pm 0,07$ to $14,289 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ACEVEDO C., A. 2003. Efecto de la temperatura y un copigmento en la estabilidad de antocianinas de la col morada en una bebida. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Cholula, Puebla, México.http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/ia/acevedo_c_ar/
- ADRIAZOLA D. 2003. Producción de los alimentos de los dioses (*Theobroma cacao* L.). UNAS. Tingo María-Perú. p. 5-8.
- AIKPOKPODION, P. E. y DONGO, L. N. 2010. Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. *Int. J. Sustain. Cropprod* 5(4): 66-70.
- ALLAITH A., A. 2008. Antioxidant activity of Bahrainia date palm (*Phoenix dactylifera* L. fruit of various cultivars. *Int. J Food Sci. Tech.* 43: 1033-1040.
- ANDERSON, D y PHILLIPS, B. 2001. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 37: 1015-1025.
- ANDREW, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C. y STEIN, M. 1989. Plants metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosydes from *Uncaria tomentosa* and *Gueterda playpoda*. *Journal of*

- natural products. Vol. 52: 679-685.
- ANDRIOLI, T. E. 2000. Free radicals and oxidative stress. *J. Am. Med.* 180: 650 – 651.
- ARÉVALO, E. 2004. Cacao manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonía peruana. Editorial del Castillo. Chiclayo-Perú. p. 115-127.
- ARLORIO, M.; COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; MIGLIO, G.; LOMBARDI, G y MARTELLI, A. 2005. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂ *Food Research International*. 38: 1009–1014.
- AVELLO, M. y SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- AWIKA, J. M.; ROONEY, LL. W. y WANISKA, R. D. 2004. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food chemistry* 90: 293-301 p.
- BADUI DERGAL, S. 1981. Química de los alimentos. Editorial Alambra. Primera edición. México. p 278-81.
- BADUI DERGAL, S. 1988. Diccionario de tecnología de los alimentos. Editorial Alambra. Primera edición. México. 298p
- BORS, W., HELLER, W., CRISTA, M., COLS. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods enzymol.* Vol. (186): 343 – 355.
- BRAND WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. 1995. Use of free radical

- method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss Technol.* 28: 25-30.
- CHESMAN, E. E. 1944. Fertilization and embryogeny in (*Theobroma cacao* L). *Ann. Of. Bot.* 41 (161): 107-127.
- CIENFUEGOS JOVELLANOS, E., DEL MAR QUIÑONES, M., MUGUERZA, B.; MOULAY, L., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. 2009. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J. Agric. Food Chem. Madrid Spain.* 57 (14):6156-6162.
- CORDOVA, Z. 2003. Estadística descriptiva e inferencial. Aplicaciones. Quinta edición. Edit. Librería Moashera S.R.L. Lima – Perú. 87p.
- CUBERO, E.; ENRÍQUEZ, G.; HERNÁNDEZ, A. y RODRIGUEZ, T. 1992. Calidad del cacao en cuatro zonas cacaoteras de Costa Rica. *Turrialba* Vol. 42, N° 3 287-293.
- DAS, DK. 1994. Naturally. Accuarng falvonoids: structure chemistry, and high – performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Emzimol.* 234:410 – 420.
- DEL VALLE L., G.; GONZALEZ L. A. y BÁEZ S. R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinífera* L.) y su relación con el color. *Chipango – México* vol. 28, (4): 359-368.
- DE MENDIBURU D. 2007. Modelo estadístico. Modelos de efectos fijos, aleatorios y mixtos. (PDF) CAPITULO III: Diseño Completamente al Azar, características, ventajas y desventajas. Arreglo Factorial en D.C.A., Arreglo Factorial en D.B.C.A. Aleatorización

tarwi.lamolina.edu.pe/.../index.../metodos1.htm - En caché – Similares.

- DIPLOCK, A. 1991. Antioxidant nutrients and disease prevention and overview
Am J. Clin. Nutr. 53: 93-189.
- EL KAR, CH.; FERCHICHI, A.; ATTIA, F. y BOUAJILA J. 2011. Pomegranate
(*Punica granatum*) juices: chemical composition, Micronutrient cations,
and antioxidant capacity. J Food science vol. 76 N° (6):C 795-800.
- GONZALES, F.; ANTEPARRA, M.; ADRIAZOLA, J; NATIVIDAD, R. y GARCIA,
L. 2007. Cultivos industriales tropicales: cacao, café y palma aceitera.
UNAS-Tingo María – Perú.
- GONZALES TORRES, M.; BETACOURT RULE, M. y ORTIZ MUÑOZ, R. 2000.
Daño Oxidativo y Antioxidantes. Bioquímica. Universidad Autónoma
Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México. 25(1): 3-9.
- HALLER, W. y FORKMANN, G. 1993. Biosynthesis, in the flavonoides.
Advances in research since 1986 (Harbone JB9). Chapman and Hall
Ltda. London. 499 – 535.
- HALLIWELL, B. 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human
disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. Br
J Exp Pathol 70, 737- 757.
- HARDY, F. 1970. Manual del Cacao. Editorial Turrialba. Costa Rica. 430 p.
- HAVSTEEN, B. 1983. Flavonoids. A class of natural products of high
pharmacological potency. Biochem pharmacol. 32: 1141 – 1148.
- HERNÁNDEZ M., A. 2003. Estabilización de antocianinas extraídas de rosas
rojas por medio de la copigmentación para su uso como colorantes
naturales en la industria alimenticia y farmacéutica. Universidad de las

América Puebla. Escuela de Ciencias. Departamento de Química y Biología. Cholula, Puebla, México. [En línea]:

HERNADEZ, R.; FERNANDEZ C. y BAPTISTA L. 2001. Metodología de la investigación. Edit. McGraw - Hill interamericana de editores, S.A. México. 503 p.

HOPIA, I., KOHKONEN, P., VOURELA, J., RAHUA, P., PIHLAJA, K., KUJALA, S.; HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. 47 (101): 1347 – 1349.

HUANCA M., J. A. 2010. Polifenoles totales, catequina y actividad antioxidante en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado. Tesis. Tingo María. 83 p.

ISMAIL, AMIN y LYE YEE, CH. 2006. Antioxidative effects of extracts of cocoa shell, roselle seeds and a combination of both extracts on the susceptibility of cooked beef to lipid oxidation. J of Food Technology 4(1): 10-15.

INDECOPI. 2007. Normas técnicas peruanas: NT/210.003, NT/208.005.

ITINTEC. 1994. Normas técnicas: 208.002, 210.003

JONFIA ESIEN, W. A.; WEST, G.; ALDERSON, P. G. y TUCKER, G. 2007. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. Food Chemistry. 108: 1135 – 59.

JU, ZHI Y. y HOWARD, LUKE R. 2005. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. J of food science-vol. 70 N° 4: 270-76.

KUSKOSKI, E.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI-FILHO, J. y FETT, R.

2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos. Campinas.* 25 (4): 726-732.
- LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.; DURIEZ, P.; TESSIER, E. y COTELLE, N. 2000 Antioxidant properties of di-tert-butyl hidroxy lated flavonoids. *Free Rad. Biol. And Med.* 29:290-291.
- LÓPEZ, A.; GARCÍA, N. y VASCONCELOS, M. 2003. Avaliacao das condicoes de torracao após a fermentacao de amendoas de Cupuacu (*Theobroma grandiflorum schum*) e Cacau (*Theobroma cacao* L). *Brazilian Journal. Food Technology.* 6(2): 309 – 316.
- LÓPEZ R., R.; QUIÑONES, W. y ECHEVERRI, F. 2007. Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos *Scientia et Technica* Año XIII, UTP. ISSN 0122-1701. <http://www.utp.edu.co/php/revistas/ScientiaEtTechnica/docsFTP/225442275-276.pdf>.
- MARTINEZ FLORES, J.; GONZALES GALLEGO, J.; CULEBRAS M. y TUÑÓN, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Departamento de Fisiología, Universidad de León y hospital de León España. 17: 271-278.
- NIEMENAK, N., ROHSIUS, C., ELWERS, S., OMOKOLO, D., LIEBEREI, R. 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of food composition and analysis.* Hamburg, Germany. 19: 612 – 19.
- ODRIOZOLA, S. 2009. Obtención de zumos y frutos cortados con alto potencial

- antioxidante mediante tratamientos no térmicos. Memoria para optar el grado de Doctor. Universidad de Lleida. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Brazil. 367 p.
- OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N., ADENAN, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chemistry. Kuala Lumpur, Malaysia. 100: 1523-1530
- OTHMAN, A.; MHD J., A.; KIN W.,K.; ISMAIL, A.; ABD.GHANI, N. y ADENAN, L. 2010. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. J of Biotechnology Vol. 9(7):1052-1059.
- PADILLA, F., RINCON, A., BOU-RACHED, L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Unidad de Análisis de Alimentos. Caracas, Venezuela. 58 (3): 303 – 308.
- POLYAKOV, N.; LESHINA, T.; KONOVALOVIA, T. y KISPERT, L. 2001. Carotenoides as scavengers of free radicals in fenton reaction: Antioxidantes or prooxidants. J. free rad. Boil. Andmed. 31(3): 398 – 404.
- POO B., S. 2005. Concentración de Antocianinas en Jugo de Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante Nanofiltración Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en alimentos. Valdivia – Chile. [En línea]:
- QUINTERO H. C. M. 2004.Efecto de la copigmentación sobre el color y estabilidad del pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ciencias. Departamento de Química y Biología. Cholula, Puebla, México.

- REILLY, P. y BULKEY, G. 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites, *Br J Surg* 77.
- RODRIGUEZ, P.; D'AMICO, N.; DE PASQUALE, R. y COSTA, G. 2001. Effects of *Vaccinium myrtillus* Anthocyanins on Triiodothyronine Transport in the Rat. *Pharmacol. Res.* 22 (Suppl. 3): 59-60.
- ROHSIUS, C.; ANDERSSON, M.; NIEMENAK, N.; SUKHA, D.; LIEBEREI, REINHARD. (2006). Calidad de la fermentación y su dependencia en la estructura de la testa y en procesos de transporte. Conferencia internacional sobre investigaciones del cacao N° 11. p 86. Costa Rica
- ROSALES L., M. 2003. Optimización del proceso de bioseparación de compuestos fenólicos a partir de dos variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz azul (*Zea mays* L.) y jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L). Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). Laboratorio de Biotecnología. Monterrey, México.
- SALINAS M., Y.; ROJAS H., L.; SOSA M., E. y PÉREZ H., P. 2005. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *Agrociencia*.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L. y MILLER, M. 2001. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Publicación aceptada. *Food chemistry*. 1-23 p.
- SIES, H. 1997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. Vol 38 USA Academic Press. Inc. 293 p.
- STAHL, L.; MILLER, K. B.; APGAR, J.; SWEIGART, D.S.; STUART, D. A.; MCHALE, N.; OU, B.; KONDO, M.; y HURST, W. J. 2009.

- Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *J of Food Science* vol. 74(6) : 456 – 61.
- STRACK D. y WRAY, V.1994. The anthocyanins glycosides In: the flavonoides. J BHarbone (ed). Chapman Hall. London, UK. p: 1-22.
- SULLCA, B. 1992. Tecnificación del cacao en la selva peruana. Fundeagro. Lima – Perú.
- SUN T. y HO C-T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts *Food Chem.* 90: 743-749.
- THOMAS, M. 2000. The Role of free radicals and antioxidant *Nutrition Volume* 16. Numbers 718.
- TOMAS BARBERAN, F. A.; CIENFUEGOS JOVELLANOS, E.; MARIN, A.; MUGUERZA, B., GIL-IZQUIERDO, A.; CERDÁ, B.; ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J., IBARRA, A.; PASAMAR, M. A., RAMON, D. y ESPIN, J. 2007. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J. Agric. Food Chem.* Valencia, Spain. Vol 55 (10): 3926 – 35.
- UGARTONDO, C. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Facultad de farmacia. Universidad de Barcelona, España. 48 p.
- VARGAS S., G.; SOTO H., R. M. y RODRIGUEZ G., M. T. 2002. Preliminar analysis of anthocyanins of the cocoplum fruit (*Chrysobalanus icaco* L.) México. Vol. 25 N° 3: 261- 64

- VASCONCELLOS, A. 2000. Alimentos Funcionales conceptos para la salud. Institute Food Techology (ITF). California USA 15 p.
- WAGNER, H. y FARKAS, L. 1975. Synthesis of flavonoids. The flavonoids. Part I (Harborne JB, Mabry. TJ and Mabry H eds). Academic Press, New York. p. 127 – 213.
- WINKEL B., SHIRLEY. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plan Physiol.* 126: 485-493p.
- WOOD, G. A. R. 1982. Cacao. ED. Continental. S.A. México, 363p.
- YILDIRIM, A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activity of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4083 – 4089.
- ZHAO, J., WANG, J., CHEN, Y., AGARWAL, R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse aking two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* 20 (9): 1737-1745.

VIII. ANEXO

A-I. Análisis de varianza cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100g muestra) en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig
Tratamientos	15	36,6039	2,4403	61,34	0,0001	**
Lugar	1	1,4502	1,4502	36,45	0,0001	**
Casa comercial	3	12,8883	4,2961	107,99	0,0001	**
Calidad	1	6,4258	6,4258	161,53	0,0001	**
Lugar * casa comercial	3	6,7239	2,2413	56,34	0,0001	**
Lugar * calidad	1	0,4204	0,4204	10,57	0,0430	*
Casa * calidad	3	4,1213	1,3738	34,53	0,0231	*
Lugar * casa*calidad	3	4,5741	1,5247	38,33	0,0001	**
Error experimental	64	2,5460	0,0398			
Total	79	39,1498				

$R^2 = 0,9350$ $CV = 3,8882$ $MSE = 0,1995$ $Media = 5,1296$

A-II. Análisis de varianza contenido de polifenoles totales en dos calidades de granos de cacao comercial "buenos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	24,1430	3,4490	71,61	0,0001	**
Error experimental	32	1,5412	0,0482			
Total	39	25,6842				

$R^2 = 0,9400$ $CV = 4,0543$ $MSE = 0,2195$ $Media = 5,4130$

A-III. Análisis de varianza contenido de polifenoles totales en granos de cacao comercial "defectuosos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	6,0351	0,8622	27,46	0,0001	**
Error experimental	32	1,0048	0,0314			
Total	39	7,0398				

$R^2 = 0,8573$ $CV = 3,6564$ $MSE = 0,1772$ $Media = 4,8462$

A-IV. Análisis de varianza contenido de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g de muestra) en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Pvalor	Sig
Tratamientos	15	709,2610	47,2841	889,47	0,0001	**
Lugar	1	379,9294	379,9294	7146,93	0,0001	**
Casa comercial	3	147,3392	49,1131	923,88	0,0001	**
Calidad	1	3,5987	3,5987	67,70	0,0001	**
Lugar * casa	3	164,6187	54,8729	1032,23	0,0001	**
Lugar * calidad	1	6,4394	6,4394	121,13	0,0001	**
Casa * calidad	3	2,8289	0,9430	17,74	0,0001	**
Lugar * casa*calidad	3	4,5067	1,5022	28,26	0,0001	**
Error experimental	32	1,7011	0,0532			
Total	47	710,9621				

$R^2 = 0,9976$ $CV = 4,2992$ $MSE = 0,2306$ $Media = 5,3629$

A-V. Análisis de varianza para antocianinas en granos de cacao comercial
"buenos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	402,7347	57,5335	1196,28	0,0001	**
Error experimental	16	0,7695	0,0481			
Total	23	403,5042				

$R^2 = 0,9981$ $CV = 3,8906$ $MSE = 0,2193$ $Media = 5,6368$

A-VI. Análisis de varianza para antocianinas en granos de cacao comercial
"defectuosos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	302,9275	43,2754	743,23	0,0001	**
Error experimental	16	0,9316	0,0582			
Total	23	303,8592				

$R^2 = 0,9969$ $CV = 4,7417$ $MSE = 2,4130$ $Media = 50,8899$

A-VII. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig
Tratamientos	15	16438,8172	1095,9212	392,51	0,0001	**
Lugar	1	3047,2056	3047,2056	1091,38	0,0001	**
Casa comercial	3	1211,7928	403,9309	144,67	0,0001	**
Calidad	1	2106,8865	2106,8865	754,60	0,0001	**
Lugar * casa comercial	3	9730,3421	3243,4474	1161,66	0,0001	**
Lugar * calidad	1	11,6702	11,6702	4,18	0,0430	*
Casa * calidad	3	27,4858	9,1619	3,28	0,0231	*
Lugar * casa*calidad	3	303,4342	101,1447	36,23	0,0001	**
Error experimental	128	357,3855	2,7920			
Total	143	16796,2027				

R² = 0,9787 CV = 2,5394 MSE = 1,6710 Media = 65,8023

A-VIII. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH de cacao comercial "buenos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	6997,2749	999,6107	336,26	0,0001	**
Error experimental	64	190,2547	2,9727			
Total	71	7187,529585				

R² = 0,97353 CV = 2,7819 MSE = 1,7242 Media = 61,9772

A-IX. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH de cacao comercial "defectuosos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	7334,6558	1047,8080	401,24	0,0001	**
Error experimental	64	167,1308	2,6114			
Total	71	7501,7866				

R² = 0,9777 CV = 2,3209 MSE = 1,6160 Media = 69,6273

A-X. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo en dos calidades de granos de cacao comercial de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig
Tratamientos	15	522,2685	34,8179	549,49	0,0001	**
Lugar	1	143,0874	143,0874	2258,19	0,0001	**
Casa comercial	3	39,7658	13,2553	209,19	0,0001	**
Calidad	1	60,2629	60,2629	951,06	0,0001	**
Lugar * casa comercial	3	270,5506	90,1835	1423,26	0,0001	**
Lugar * calidad	1	0,0608	0,0608	0,96	0,3291	NS
Casa * calidad	3	0,2618	0,0873	1,38	0,2527	NS
Lugar * casa*calidad	3	8,2791	2,7597	43,55	0,0001	**
Error experimental	128	8,1106	0,0634			
Total	143	530,3791				

R² = 0,9847 CV = 2,3436 MSE = 0,2517 Media = 10,7409

A-XI. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo de cacao comercial "buenos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	227,9759	32,5680	517,49	0,0001	**
Error experimental	64	4,02778	0,0629			
Total	71	232,0037				

$R^2 = 0,9826$ $CV = 2,4846$ $MSE = 0,2509$ $Media = 10,0967$

A-XII. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo de cacao comercial "defectuosos" de Tingo María y Tocache.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamiento	7	233,9921	33,4274	518,95	0,0001	**
Error experimental	64	4,1225	0,0644			
Total	71	238,1146				

$R^2 = 0,9827$ $CV = 2,2287$ $MSE = 0,2538$ $Media = 11,3878$

A-XIII. Coeficiente de correlación de granos cacao comerciales (buenos y defectuosos) acopiados en Tingo María y Tocache.

Correlación de Pearson: Coeficientes/Probabilidades				
	Polifenoles	Antocianinas	DPPH	Peroxilo
Polifenoles	1,00	0,13	4,2E-04	6,6E-04
Antocianinas	0,39	1,00	0,02	0,01
DPPH	-0,78	-0,57	1,00	0,00
Peroxilo	-0,76	-0,61	0,99	1,00

A-XIV. Análisis de componentes principales en granos cacao comerciales
(buenos y defectuosos) acopiados en Tingo María y Tocache.

Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Prop. acumulada
1	3,09	0,77	0,77
2	0,64	0,16	0,93
3	0,27	0,07	1,00
4	4,7E-03	1,2E-03	1,00

Autovectores		
Variables	e1	e2
Polifenoles	-0,48	-0,48
Antocianinas	-0,40	0,86
DPPH	0,55	0,14
Peroxilo	0,55	0,08

Correlación con las variables originales		
Variables	CP1	CP2
Polifenoles	-0,84	-0,38
Antocianinas	-0,71	0,69
DPPH	0,97	0,11
Peroxilo	0,97	0,06

Correlación cofenética = 0,991