

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 ABTS) DURANTE EL
PROCESAMIENTO DEL LICOR DE CACAO Y POLVO DE
CACAO**

Tesis

Para optar al título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

RONALD EDUARDO CHÁVEZ RIVERA

Tingo María – Perú

2012



**QO4
C71**

Chavez Rivera, Ronald Eduardo

“Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS), Durante el Procesamiento del Licor de Cacao y Polvo de Cacao”. Tingo María, 2013

105 páginas.; 16 cuadros; 22 fgrs.; 88 ref.; 30 cm.

Tesis (Ingeniero en Industrias Alimentarias) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). F.I.A.

**1. POLIFENOLES 2. ANTOCIANINAS 3. CACAO
4. ANTIOXIDANTES 5. REDUCCION 6. LICOR DE CACAO**



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

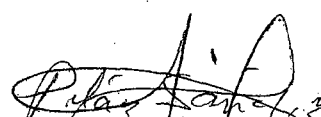
Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 11 de setiembre de 2012, a horas 6:30 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bach. **CHAVEZ RIVERA, Ronald Eduardo**, titulada:

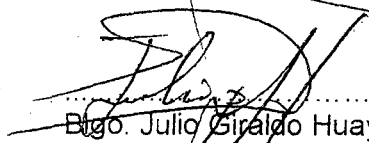
“POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH Y ABTS) DURANTE EL PROCESAMIENTO DEL LICOR DE CACAO Y POLVO DE CACAO”

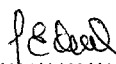
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **MUY BUENO**; en consecuencia el Bachiller, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con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

Tingo María, 11 de octubre de 2012


.....
Dr. Raúl Natividad Ferrer
Presidente


.....
Dr. Pedro Pelaez Sánchez
Miembro


.....
Bgo. Julio Giraldo Huayta
Miembro


.....
Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez
Asesora

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo a Dios que me ha dado la vida y fortaleza para terminar este proyecto de investigación.

Gracias señor. Por permitirme dar un paso más en mi vida.

A mis abuelitas: LUCIA FALCON JARA y ROSA GARCIA SANCHEZ con mucho cariño y respeto por sus enseñanzas y sabios consejos para superarme y crecer como profesional.

A mi tío: ALEJANDRO ADRIANO CHAVEZ FALCON, por sus sabios consejos y apoyo incondicional en la ejecución del presente trabajo de investigación mi más eterno agradecimiento.

A mi madre: SUNILDA EDALZEIN RIVERA GARCIA, mi más profundo agradecimiento y eterna gratitud por ser mi guía y mostrar siempre una imagen de perseverancia ante toda circunstancia esquivando a nuestra realidad y finalmente gracias a su esfuerzo usted fue partícipe de la culminación de mi carrera profesional.

A mis hermanos: HENRY, RANDY, JESSICA Y HAROLD por su apoyo incondicional en la ejecución del presente trabajo de investigación mi más eterno agradecimiento, y a la vez por permitirme construir un camino para mis antecesores.

A mi padre: ALEJANDRO FLOREANO CHAVEZ FALCON, agradecerte por tus enseñanzas duras y correctas en las diversas actividades del hogar, ya que ello fue muy importante en mi formación como persona.

A nuestros profesores quienes son nuestros guías en el aprendizaje, dándonos los últimos conocimientos para nuestro buen desenvolvimiento en la sociedad

AGRADECIMIENTO

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva y a la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, por ser el alma mater donde culmine mi carrera profesional y por haberme formado como profesional.

Un agradecimiento especial a la Dra. Elizabeth Susana Ordoñez Gómez, por la colaboración, paciencia, apoyo, por su valiosa orientación como patrocinadora de la tesis.

Al Ing. Davy Hidalgo Chávez, por mostrarse siempre como una persona comprometida a la investigación y por sus sabios consejos oportunos.

A mis amigos: Saúl, Andrés, Danny, Pedro, Carlos Salazar, Omar, Ever, Evil, Wilmer, Cristian, Bryan, Diego, Marcos, Mariela, Pierina, Fresia, Guadalupe

A todas aquellas personas que hicieron posible la culminación de este trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos generales del cacao (<i>Theobroma cacao L</i>).....	3
2.2 Generalidades del licor de cacao y polvo de cacao.....	8
2.3 Generalidades de polifenoles.....	11
2.4 Generalidades de antocianinas.....	14
2.5 Generalidades de antioxidantes.....	19
2.6 Radicales libres.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Lugar de ejecución.....	28
3.2 Materia prima.....	28
3.3 Equipos, materiales y reactivos.....	29
3.4 Métodos de análisis.....	31
3.5 Metodología experimental.....	32
IV. RESULTADO Y DISCUSIONES.....	46
4.1 Cuantificación de polifenoles totales durante las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.....	46
4.2 Cuantificación de antocianinas durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.....	55

4.3	Determinación de la capacidad antioxidante del coeficiente de inhibición (IC ₅₀) del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH).	61
4.4	Determinación de la capacidad antioxidante del coeficiente de inhibición (IC ₅₀) del radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS).	70
4.5	Análisis de multivariado - componentes principales.....	76
V.	CONCLUSIÓN.....	81
VI.	RECOMENDACIÓN	82
	ABSTRACT.....	83
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
VIII.	ANEXO.....	97

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química de las almendras de cacao.....	7
2. Partes sustituibles de las antocianinas.	16
3. Clasificación de los antioxidantes.	22
4. Importancia biológica de radicales libres.	27
5. Muestreos realizados en la Planta Industrial de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo.....	29
6. Preparación de soluciones de trabajo frente al radical DPPH.	41
7. Preparación de soluciones de trabajo frente al radical ABTS.....	43
8. Contenido de polifenoles totales en los diferentes lotes de muestreo.	48
9. Cuantificación del contenido de polifenoles totales en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.....	50
10. Contenido de antocianinas totales en los diferentes lotes de muestreo.....	56
11. Cuantificación del contenido de antocianinas en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.	59
12. Resultados del IC ₅₀ del radical DPPH en los diferentes lotes de muestreo.....	62
13. Resultados del IC ₅₀ del radical DPPH en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.....	65
14. Resultados del IAA en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao	69

15. Resultados del IC ₅₀ del radical ABTS en los diferentes lotes de muestreo.....	72
16. Resultados del IC ₅₀ del radical ABTS en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Flujograma para la obtención del licor de cacao y polvo de cacao.....	10
2. Estructura química de los polifenoles.	13
3. Estructura más común de la antocianina glucosilada.	15
4. Estructura de antocianinas a diferentes pH's.....	18
5. Reacción de descoloramiento del DPPH al ser reducido por los antioxidantes.....	25
6. Muestreos realizados en el flujograma de obtención del licor de cacao y polvo de cacao.	34
7. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.	35
8. Esquema experimental para la cuantificación de polifenoles totales.	38
9. Esquema experimental para la cuantificación de antocianinas.....	40
10. Esquema experimental para la determinación de la actividad antioxidante (radical DPPH).	42
11. Esquema experimental para la determinación de la actividad antioxidante (radical ABTS).	44
12. Representación del contenido de polifenoles totales en los diferentes lotes de muestreo.	48

13. Representación del contenido de polifenoles totales en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.	51
14. Representación del contenido de antocianinas en los diferentes lotes de muestreo.	56
15. Representación del contenido de antocianinas en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao	59
16. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en los diferentes lotes de muestreo.	62
17. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en las diferentes etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.	65
18. Comportamiento del IAA en las diferentes etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.....	70
19. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical ABTS en los diferentes lotes de muestreo.	72
20. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical ABTS en las diferentes etapas de proceso.	74
21. Comportamiento del biplot polifenoles totales, antocianinas, radicales de DPPH y ABTS ^{o+} en las diferentes etapas de proceso.....	77
22. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras del procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.....	79

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo	Página
A-Ia. Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g).....	98
A-Ib. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.	98
A-IIa. Análisis de varianza cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra), según los lotes de muestreo	99
A-IIb. Análisis de varianza cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra), durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.	99
A-IIIa. Análisis de varianza cuantificación de antocianina (mg cianidina-3-glucósido/g muestra), según los lotes de muestreo.....	100
A-IIIb. Análisis de varianza cuantificación de antocianina (mg cianidina-3-glucósido/g muestra), durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.	100
A-IVa. Análisis de varianza del IC ₅₀ del radical DPPH, según los lotes de muestreo.....	101
A-IVb. Análisis de varianza del IC ₅₀ del radical DPPH, durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.....	101

A-Va. Análisis de varianza IAA, durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.....	102
A-VIa. Análisis de varianza del IC ₅₀ del radical ABTS, según los lotes de muestreo.....	102
A-VIb. Análisis de varianza del IC ₅₀ del radical ABTS, durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.	103
A-VIIa. Coeficiente de correlación en las etapas del procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.....	103
A-VIIb. Análisis de componentes principales en las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.	104
A-VIIIa. Control de calidad de la evaluación física (prueba de corte en 100 granos de cacaos secos).....	105

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 ácido 2,2-azinobis(3etilbenzotiazoline)-6-acidosulfónico (ABTS) durante el proceso del licor de cacao y polvo de cacao. 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) y el diseño de bloques completo al azar (DBCA), en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$), utilizando el programa SAS versión 9.0. Para analizar todos los tratamientos de manera conjunta se utilizó el análisis multivariado con componentes principales, utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011. El mayor contenido de polifenoles totales durante el procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao fue en el grano $6,394 \pm 0,095$ g EAG/100 g y el menor fue para el grano molido $4,036 \pm 0,105$ g EAG/100 g. El mayor contenido de antocianinas fue en el grano $1,490 \pm 0,043$ mg cianidina-3-glucósido/g y el menor fue para el grano molido $0,074 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g. y la mayor capacidad de inhibición del radical DPPH fue $IC_{50} = 51,158 \pm 0,117$ μ g/mL y la mejor capacidad de inhibir del radical ABTS fue $IC_{50} = 34,918 \pm 0,054$ μ g/mL.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace más de dos siglos, el cacao en grano se ha destacado como un rubro de gran importancia comercial en el ámbito mundial, ya que éste es utilizado como materia prima para la obtención de diversos productos de la industria de alimentos (confitería, bebidas), la industria cosmetológica y la farmacéutica. De esta manera se puede identificar el proceso de comercialización, distribución e industrialización del rubro como un componente de enlace a través de todo el circuito cacaotero, el cual se inicia con el productor agrícola hasta el consumidor final.

Además el creciente interés en los últimos años por el consumo de alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud, ha incentivado el estudio de componentes naturales como los polifenoles presentes en plantas y frutos, los cuales han recibido especial atención debido a sus propiedades funcionales como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacteriales.

La comercialización de los granos de cacao de los pequeños agricultores hacia la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, es muy heterogéneo lo que permite obtener diferentes calidades de productos procesados. En este trabajo de investigación consistió en acentuar si los procesos tecnológicos influyen mucho en el contenido de antioxidantes durante

el procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao; de allí el interés despertado para realizar la investigación, para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Cuantificar el contenido de polifenoles totales y antocianinas durante el procesamiento de licor de cacao y polvo de cacao.
- Cuantificar la capacidad antioxidante durante el procesamiento de licor de cacao y polvo de cacao mediante la capacidad de inhibir radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6-ácido sulfónico) (ABTS+).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales del cacao (*Theobroma cacao L.*)

2.1.1. Origen y distribución geográfica del cacao.

MINISTERIO DE AGRICULTURA (2000), menciona que el cacao es una planta originaria de la Amazonia, presenta la mayor diversidad de especies en los correspondientes ámbitos geográficos de Perú, Colombia, Ecuador y Brasil, existiendo sin embargo una significativa variabilidad en la Cuenca del Rio Orinoco y en la Mesopotamia, donde se pueden mostrar especímenes silvestres.

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" (HARDY, 1970).

WOOD (1982), menciona que el cacao (*Theobroma cacao L.*), 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, de México hasta Brasil y Bolivia, su centro de origen está en la cuenca del Amazonas y el Orinoco.

2.1.2. Clasificación 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	:	Theobroma
Especie	:	<i>Theobroma cacao</i> L.
División	:	Spermatophyta
Sub división	:	Angiosperma

2.1.3. Clasificación botánica.

CHEESMAN (1944), citado por WOOD (1982), reconoció la dificultad de aplicar el término de variedad a la clasificación del cacao y prefirió hablar de poblaciones que pueden o no presentar intergraduaciones, pero al mismo tiempo tienen características por las que pueden distinguirse entre sí. Este autor sugiere la clasificación siguiente:

2.1.3.1. Cacao criollo.

Corresponde a una planta de poco vigor y bajo rendimiento,

destacándose la alta calidad de sus semillas; los granos son gruesos de sección casi redonda, con los cotiledones frescos de color blanco considerado comercialmente como cacao fino, muy aromático, con ligero amargor, usado en la chocolatería de lujo, más sensible a las enfermedades (BRAUDEAU, 1981).

2.1.3.2. Cacao forastero.

WOOD (1982), manifiesta que el cacao forastero se caracteriza por ser de mayor tolerancia a las enfermedades que el cacao Criollo. Representa aproximadamente un 95 % de la producción mundial, proveniente de los países de África Occidental y Brasil. Parecen ser originarios de la alta Amazonía y están dispersados por la cuenca del Amazonas (BRAUDEAU, 1981).

2.1.3.3. Cacao trinitario.

Pertenecen a poblaciones híbridas, resultado del cruzamiento natural del tipo Criollo y Forastero, presentan una gran heterogeneidad. Aunque originalmente se aplicó a la población de Trinidad, ahora abarca algunos países tales como Sri Lanka, Indonesia y Papua-Nueva Guinea (WOOD, 1982).

2.1.3.4. Cacao CCN-51.

CCN-51 significa Colección Castro Naranjal, porque es una colección de clones, su autor se apellida Castro y fue creada en la población de Naranjal. El número 51 es la secuencia de los clones que investigó hasta llegar

al 51 que es la variedad que obtuvo éxito y brindó las características requeridas. Es una variedad ecuatoriana que crece en la zona tropical del país, es conocida como clon de alta calidad, y de excelente productividad y tolerancia a enfermedades como la escoba de bruja y *ceratoystisfimbriata* (CRESPO y CRESPO, 1997).

El cultivo de cacao CCN-51, necesita clima caliente y húmedo con temperatura promedio anual 23 a 26°C, precipitación anual entre 1500 a 2500 mm con un mínimo mensual entre 100 a 120 mm. La mazorca del CCN51 tarda aproximadamente 140 días en madurar en los meses calurosos, mientras que en los meses más frescos se demoran 160 días (CRESPO y CRESPO, 1997).

La variedad CCN51 tiene buen rendimiento y resistencia a las enfermedades fungoideas comunes, haciéndole una alternativa aceptable. El clon también puede competir en los mercados exigentes en lo que se refiere a calidad; con un manejo pos cosecha y una buena fermentación el cacao CCN-51 alcanza rendimientos sobre 4000 kg de grano seco/Ha (ESPINOZA *et al.*, 2006).

2.1.4. 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 (GONZÁLEZ *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) tal como se presenta en el siguiente Cuadro.

Cuadro 1. Composición química de las almendras de cacao.

Componentes	Composición (% peso fresco)
Pulpa	
- Agua	82 - 87
- Azúcares	10 - 13
- Pentosas	2 - 3
- Ácido cítrico	1 - 2
- Sales	8 - 10
Cotiledón	
- Agua	32 - 39
- Celulosa	2 - 3
- Almidón	4 - 6
- Pentosas	4 - 6
- Sacarosa	2 - 3
- Grasa	30 - 32
- Proteínas	8 - 10
- Teobromina	2 - 3
- Cafeína	1
- Ácidos	1
- Polifenoles	5 - 6

Fuente: Hill *et al.*, (2009).

2.1.5. 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. GONZÁLEZ *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.

2.1.6. 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.

2.2. Generalidades del licor de cacao y polvo de cacao.

2.2.1. Definición de licor de cacao.

El licor de cacao es el producto obtenido del cacao sin cáscara ni germen que se obtiene de vainas de cacao de calidad comerciable, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos (CODEX STAN 141-1983, 2001).

El licor o pasta de cacao puede servir para la producción de chocolates, manteca y polvo de cacao (BRAUDEAU, 1981).

2.2.2. Definición del polvo de cacao.

El polvo de cacao natural es un producto obtenido por la transformación mecánica en polvo de la torta del prensado de cacao. La torta

de cacao es producto obtenido por prensado de pasta, masa o licor de cacao, con extracción parcial de la materia grasa (CODEX STAN 141, 2001). Su contenido en grasa del polvo de cacao es de 8% y podrá contener hasta un 6% de cascarilla y tendrá como máximo un 5 % de humedad (CODEX STAN 141-1983, 2001).

2.2.3. Definición cocoa-vainilla.

Polvo fino de color marrón claro, obtenido de la mezcla de cacao polvo, el cual también se añade vainilla, producto de consumo directo especial para desayunos (BRAUDEAU, 1981).

2.2.4. Descripción del proceso tecnológico para obtención de polvo de cacao y licor de cacao.

- **Selección:** La selección del grano depende de la calidad del sabor de que desee y del producto que se prepare, esta selección se hace en base a las características particulares de cada variedad (DESROSIER, 1985).

- **Limpieza y cribado de los granos:** Las habas son generalmente limpiadas y cribados mediante el paso por unos tamices de agitación continua. Unos imanes eliminan las partículas metálicas, las pérdidas por cribado son del orden de 1 al 1,5% en peso (BRAUDEAU, 1981).

- **Tostado:** Es una de las operaciones más importantes cuyo papel es múltiple: permite la separación de la almendra y de las cascarillas; elimina en parte la acidez acética del cacao; reduce el índice de humedad hasta el nivel de 2,5 al 5%; desarrolla principios aromáticos que dan al

chocolate su aroma característico (BRAUDEAU, 1981).

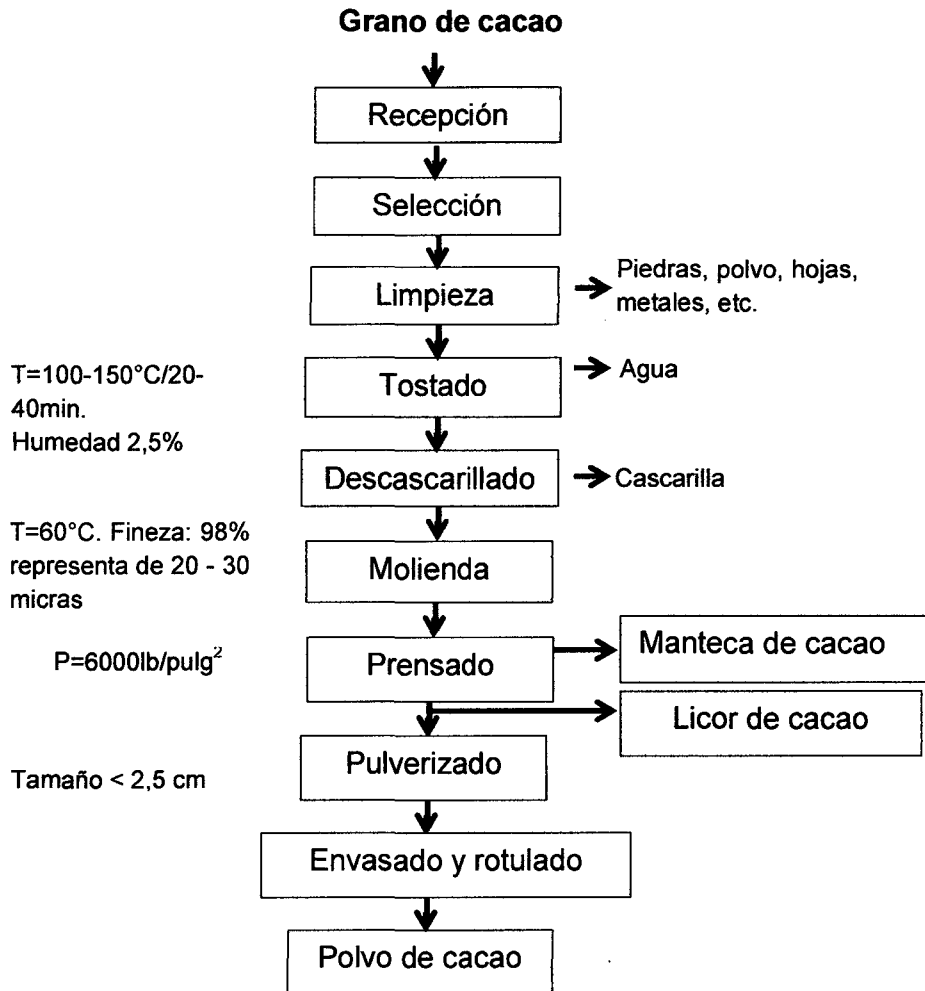


Figura 1. Flujograma para la obtención del licor de cacao y polvo de cacao.

- **Descascarillado:** La calidad del chocolate y de la cocoa depende de la completa eliminación de la cascarilla, esta es de material fibroso de difícil molienda, no digerible y sin valor nutritivo, además puede comunicar propiedades sápidas aromáticas desagradables al chocolate (MONTES, 1981).

- **Molienda:** La molienda del cacao se realiza hasta obtener

partículas de unas 100 micras de diámetro, la operación se realiza en un molino de martillos y la temperatura sube a unos 60°C, con lo que funde la manteca de cacao. La refinación se hace por unos rodillos que aplastan la pasta de cacao o por molinos con tamizado muy fino, las partículas de cacao se reducen de 100 a 20 – 30 micras (MADRID, 2001).

- **Prensado:** En el prensado la manteca de cacao se separa del polvo. La primera parte del ciclo del prensado, se separa la manteca de los sólidos como en la filtración normal. Sin embargo, la segunda parte empieza cuando la prensa se llena con sólidos y un ariete hidráulico que alcanzan presiones hasta de 6000lb/pulg². Lo comprime extrayendo más grasa de los sólidos de cacao restante, mientras más bajo sea el contenido de grasa mayor el tiempo del prensado (DESROSIER, 1985).

- **Pulverizado:** A medida que el prensado de cacao caen de las prensas pasan a través de quebradoras para formar una torta con partículas de menos de 2,5 cm de tamaño. La torta requiere entonces de molienda adicional o pulverización para poder ser utilizada en forma comercial (DESROSIER, 1985).

2.3. Generalidades de polifenoles

PALADINO (2008), menciona que los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo, estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis,

formación de componentes estructurales, defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia y dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal y la característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol.

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).

2.3.1. 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 Figura 2 se presenta la estructura química de algunos polifenoles.

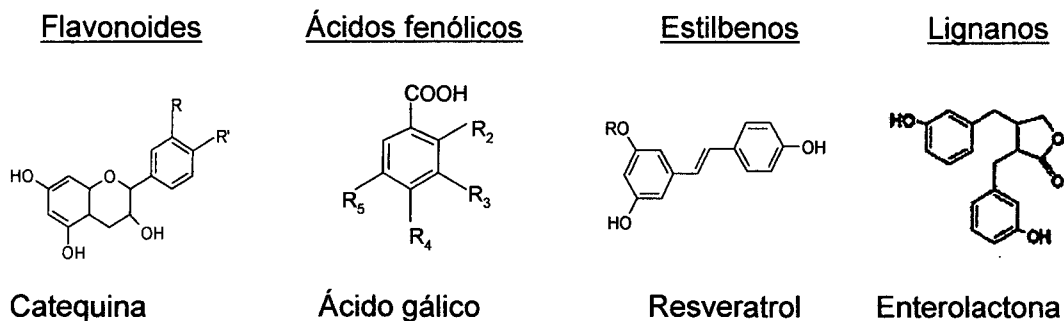


Figura 2. Estructura química de los polifenoles.

2.3.1.1. 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 compuestos polifenólicos naturales presentes en grandes variedades de vegetales, frutas y bebidas; muchos de ellos considerados como fuente importante de antioxidantes (GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

UGARTONDO (2009), indica que los flavonoides son 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).

Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos

fenilalanina, tirosina y también de unidades de acetato (HALLER y FORKMANN, 1986).

2.3.1.2. 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 hidroxicinámico. 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.

2.4. Generalidades de antocianinas.

2.4.1. Definición.

LEYVA (2009), menciona que la palabra antocianina deriva del griego anthos (flor) y kyanos (azul oscuro).

AGUILERA (2009), menciona que las antocianinas constituyen una gran familia de polifenoles en plantas y son responsables de colores para muchas frutas y flores observadas en la naturaleza. Investigaciones recientes se han enfocado a los beneficios en la salud de estos pigmentos, especialmente a su actividad antioxidante. La acumulación de datos muestra que las antocianinas y los extractos de plantas ricos en antocianinas pueden proveer diversos beneficios para la salud, incluyendo protección del DNA,

actividad anticancerígena, actividad antioxidante, actividad antidiabética y prevención de enfermedades cardiovasculares.

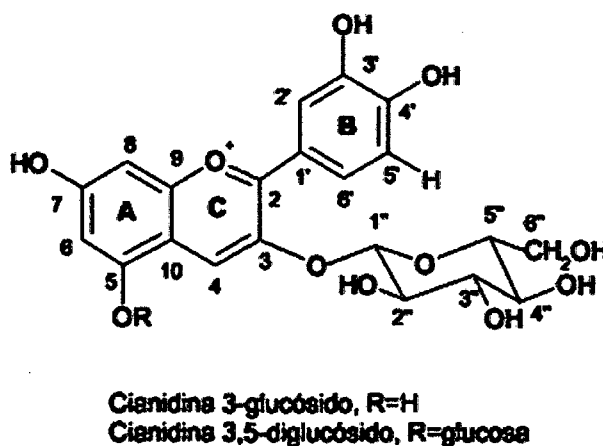


Figura 3. Estructura más común de la antocianina glucosilada.

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).

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

LEYVA (2009), indica que la antocianina es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano. La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas.

2.4.2. Estructura química.

La estructura de la antocianina es el 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio (QUINTERO, 2004).

Las antocianinas son de color rojo y violeta, solubles en agua, y están ampliamente distribuidas en la naturaleza. La estructura química de las antocianinas 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 2.

Cuadro 2. Partes sustituibles de las antocianinas.

Aglicona	Sustitución		λ máx (nm)
	r1	r2	espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	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.

AGUILERA (2009), manifiesta que la hidrólisis revelo que la cianidina es el principal aglicón. Un método práctico para cuantificar y determinar sus índices de degradación es el método diferencial de pH que se

fundamenta en las transformaciones estructurales del cromóforo de la antocianina como una función del pH, el cual puede ser medido usando espectroscopia óptica a través de un procedimiento fácil y rápido para la cuantificación de antocianinas monoméricas.

2.4.3. Estabilidad de las antocianinas.

Factores que influyen el color y estabilidad de las antocianinas como la mayoría de los colorantes naturales, las antocianinas sufren de inestabilidad inherente. Generalmente, las antocianinas son más estables bajo condiciones ácidas, pero pueden degradarse por mecanismos para formar primero productos incoloros, después productos oscuros e insolubles. La degradación puede ocurrir durante la extracción/purificación y durante el procesamiento y almacenamiento normal de alimentos. Un conocimiento de los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas y los mecanismos de degradación putativos es vital para la eficiente extracción/purificación de antocianinas y para sus usos como colorantes alimenticios. Tal conocimiento puede también conducir a una selección más prudente de fuentes de pigmentos y desarrollo de más productos alimenticios altamente coloreados. Los principales factores que influyen la estabilidad de las antocianinas son pH, temperatura y la presencia de oxígeno, pero la degradación enzimática y las interacciones con otros componentes alimenticios (ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares, co-pigmentos) no son menos importantes. En general, las antocianinas son más estables en medios ácidos, libres de oxígeno bajo condiciones frías y en oscuridad (AGUILERA, 2009).

LEYVA (2009), menciona que las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran.

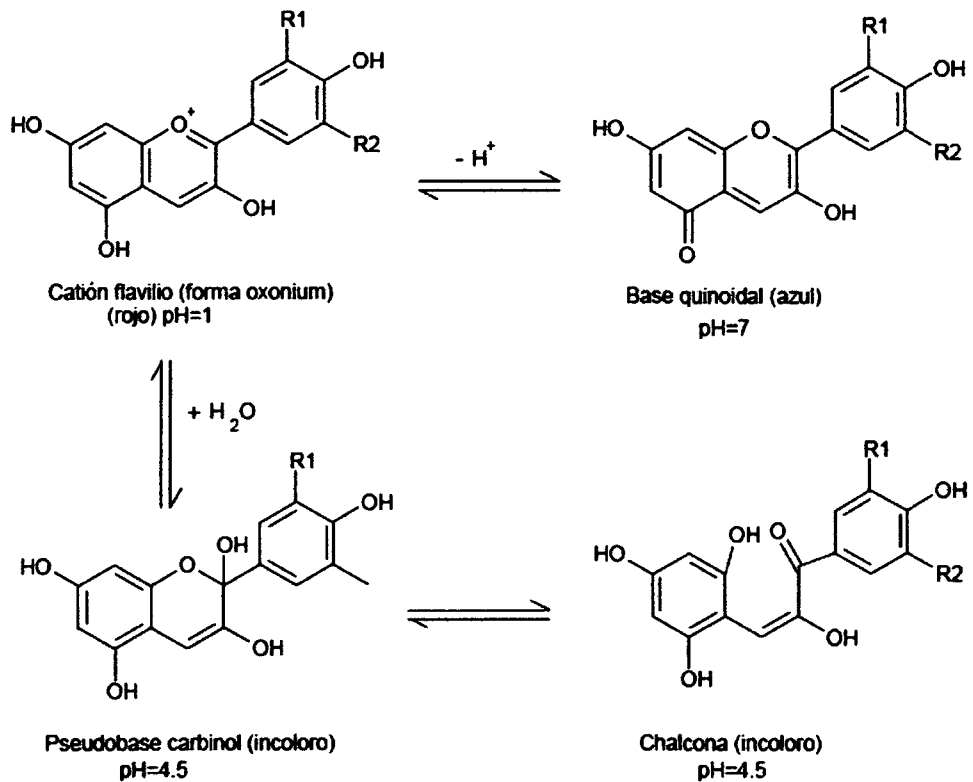


Figura 4. Estructura de antocianinas a diferentes pH's (GIUSTIN Y WROLSTAD, 2001).

Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura y concentración de las antocianinas, y la presencia de otros compuestos tales como otros flavonoides, proteínas y minerales. Uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas es el pH, dependiendo del pH las antocianinas pueden existir en cuatro especies

diferentes: base quinoidal, catión flavilio, pseudobase carbinol y chalcona. En soluciones muy ácidas (pH <0,5) la única estructura es el catión flavilio rojo, con incrementos de pH la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación da lugar a la base de carbinol incolora. Entre pH 4 y 5,5 habrá poco color, debido a que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio 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.

2.5. Generalidades de antioxidantes.

2.5.1. Definición de antioxidantes.

OVACO y PINEDA (2011), menciona que los antioxidantes son de gran interés nutricional contribuyendo al mantenimiento de salud humana protegiendo al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos.

Los antioxidantes son sustancias que pueden inhibir o retardar el proceso oxidativo, interfiriendo con la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de la auto-oxidación. La importancia de un antioxidante depende de su concentración, del medio donde actúa y de su habilidad para interaccionar con sistemas regeneradores (JURADO y MUÑOZ, 2009).

El antioxidante al colisionar con el radical libre (RL) le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Los antioxidantes son compuestos que prolongan la vida útil de alimentos, protegiendo contra el deterioro causado por la oxidación, 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 (SIES, 1997).

2.5.2. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo y el daño que éste genera están implicados en una enorme variedad de procesos naturales y patológicos como el cáncer, la *diabetes mellitus*, la aterosclerosis y enfermedades relacionadas con degeneraciones neurológicas como el Alzheimer, Parkinson, desórdenes autoinmunes y procesos del envejecimiento, todas estas dolencias se aduce que se debe al desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo.

El estado de estrés oxidativo del organismo puede combatirse con la administración de antioxidantes exógenos, que son únicamente de origen vegetal. Las vitaminas hidrosolubles (vitamina C) y liposolubles (Vitaminas A y E), junto con los compuestos fenólicos, forman el grupo más importante de compuestos naturales con capacidad antioxidante (OLIVERAS, 2005).

El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio entre la producción de los EROS (especies reactivas de oxígeno) y la de oxidación de los mismos. Es en estas condiciones que los radicales libres se tornan dañinos al ser producidos en exceso bajo ciertas circunstancias anormales como inflamación, isquemia, la presencia de iones catalíticos (Ej. Fe^{+2}), etc., o cuando disminuyen

los niveles de enzimas antioxidantes, o por ambos procesos simultáneamente (CASTEL, 2010).

2.5.3. Clasificación de los antioxidantes

2.5.3.1. Antioxidantes endógenos

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

2.5.3.2. Antioxidantes exógenos

Los agentes antioxidantes exógenos son aquellos que se ingieren a través de la alimentación y desde el punto de vista práctico son los más importantes de todos, ya que son los únicos que pueden ser introducidos al organismo de forma voluntaria por cada persona, en función de sus conocimientos sobre el tema, la disponibilidad de alimentos en un momento dado y la voluntad e interés que tenga de consumir una dieta saludable (LIMA, 2002). Los antioxidantes exógenos o no enzimáticos, transforman los radicales en menos agresivos (POLYAKOV *et al.*, 2001). En el Cuadro 3 se presenta la clasificación de los antioxidantes.

Cuadro 3. Clasificación de los antioxidantes.

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tióctico	Manganeso
	Superoxidodismutasa (SOD)	
Flavonoides	Catalasa	Hierro
	Glutación peroxidasa	
Lycopeno		Selenio

Fuente: POLYAKOV *et al.*, (2001)

2.5.4. Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante

CASTEL (2010), menciona que la evaluación in vitro de la capacidad antioxidante es aplicada como una rápida estimación de la posible actividad que una muestra tendrá in vivo o al formar parte de un alimento. Existen numerosos métodos para evaluar la capacidad antioxidante in vitro, y según la reacción que involucran, pueden ser ensayos que incluyen reacciones en las que se transfiere un electrón (TE) o un átomo de hidrógeno (TAH). En los ensayos basados en TE se produce una reacción de reducción en la que un sustrato toma un electrón del compuesto antioxidante (agente reductor). La reducción del sustrato causa en éste una alteración de color que se usa como medida del avance de la reacción y de la capacidad antioxidante de la muestra.

Algunos de los ensayos que se basan en esta reacción son: el ensayo de la capacidad secuestrante del radical ABTS, también llamado ensayo de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC); el ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP); ensayo de la capacidad reductora del Cu (II); y el método de la capacidad secuestrante del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Los métodos basados en reacciones de TAH utilizan un generador sintético de radicales libres, un sustrato oxidable (marcador) y un antioxidante donador de átomos de hidrógeno, por lo que se produce una competencia entre el antioxidante y el sustrato por los radicales libres. De este modo, la oxidación del sustrato es inhibida o retardada y esto se relaciona con la capacidad antioxidante del compuesto. Incluidos en estos métodos están el ensayo de ORAC (Capacidad de Absorbancia del Oxígeno Radical), el ensayo de decoloración de la crocina, entre otros. Por otro lado, también existen métodos que cuantifican los productos formados durante la peroxidación lipídica, los que en presencia de un antioxidante disminuyen. Algunos de estos métodos son el ensayo de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Debido a las particularidades de los métodos es extremadamente difícil comparar los resultados entre los diferentes ensayos.

2.5.4.1. Método del ABTS.

En el método ABTS (ácido 2,2-azinobis (3etilbenzotiazoline)-6-acidosulfónico) el radical tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP, enzimática

(peroxidasa, mioglobulina)). Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a una longitud de onda de 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical ABTS una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a una longitud de onda de (414, 645, 734, 815 nm), pero se mide a una longitud de onda de 734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. El radical ABTS es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de antocianos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria (OVACO y PINEDA, 2011).

2.5.4.2. Método del DPPH

El método de la capacidad de secuestrar el radical DPPH es uno de los más comunes para determinar la capacidad antioxidante de modo práctico, rápido y sensible, este método utiliza un radical cromóforo que simula las especies reactivas de oxígeno (ROS), y que en la presencia de un compuesto antioxidante se reduce y cambia de coloración (CASTEL, 2010). 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 o naranja pálido, a medida que disminuye la absorbancia detectable a 515 nm (LEBEAU *et al.*, 2000).

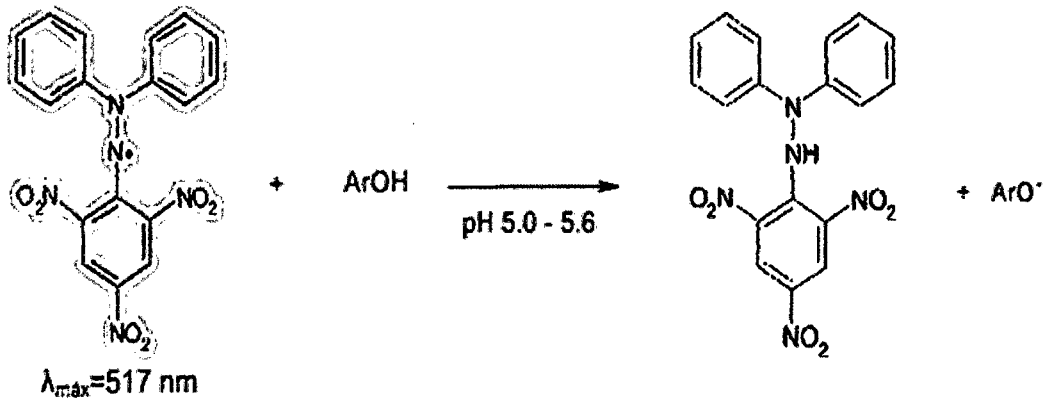


Figura 5. Reacción de descoloramiento del DPPH al ser reducido por los antioxidantes.

JULIAN (2009), indica que el DPPH antes de la reacción con el antioxidante muestra un color morado intenso, que al ser reducido adquiere una coloración amarilla.

2.6. Radicales libres.

UGARTONDO (2009), indica que los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado (aquél que ocupa una órbita atómica o molecular por sí mismo), pueden existir de forma independiente y que, debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, son generalmente muy reactivos. Esta reactividad es la base de su toxicidad y de su corta vida media. La generación de RL no se ha de relacionar

siempre con su toxicidad debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.

Cualquier molécula o átomo que contiene uno o más electrones desapareados es un radical libre (ANDERSON y PHILLIPS, 1999).

REILLY y BULKEY (1990), menciona que los radicales libres 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.

2.6.1. Formación de radicales libres.

Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula (GONZÁLEZ *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).

Cuadro 4. Importancia biológica de 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	Peróxido de hidrógeno*

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

Fuente: REILLY y BULKEY, 1990.

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).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios: Análisis de Alimentos, Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (CIPNA) y Centro de Investigación para el Desarrollo Biotecnológico de la Amazonia (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región de 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.

Las muestras fueron tomadas de las diferentes operaciones de procesamiento de licor de cacao y polvo de cacao (grano, grano tostado, grano molido, licor de cacao, polvo de cacao, cocoa-vainilla) de la Planta Industrial de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, ubicado en Afilador km. 3,5 Tingo María – Huánuco – Perú, las mismas que fueron muestreados en tres oportunidades con un intervalo de una semana. Los detalles se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro 5. Muestreos realizados en la Planta Industrial de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo.

Detalles	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo
Fecha de muestreo	11/01/12	21/01/12	29/01/12
Lote	Nº 684.	Nº 643.	Nº 643.
Acopio	Juanjui	Tingo María	Bambamarca
Humedad	8,5%	8,4%	8,5%
Status	orgánico EU JAS NOD	orgánico EU JAS NOD	orgánico EU JAS NOD
Recepción	Diciembre	Noviembre	Noviembre
Cantidad	1000 g	1000 g	1000 g

3.3 Equipos, materiales y reactivos.

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-2065FW -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 SevenEasy) pH 0-14, T° 0-100°C SN 8513902.
- Empacadora Multivac modelo A 300/16.

3.3.2 Materiales de laboratorio.

- Matraces de Erlenmeyer de 50, 100 y 250 mL.
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1000 mL.
- Tubos de ensayo Gene Mate® de 10 mL.
- Fiolas de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000.
- Probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 mL.
- Frascos ámbar de 100mL.
- Gradillas.

3.3.3 Otros Materiales.

- Micropipetas 0-10 µL, 10-100µL, 20-200µL y 100-1000 µL.
- Cubetas de poliestireno, Gene Mate® (1cmx 1cmx4.5cm).
- Tips, FISHERBRAND® (1000 y 200 µL).
- Microtubos (1,50 -2,00 mL).
- Papel de filtro y Alupol (papel trilaminado).

- Espátulas.

3.3.4 Reactivos y solventes.

- Ácido clorhídrico (HCl) (Merk) pureza 36,5%.
- Ácido gálico (C₇H₆O₅) al 98,1% Sigma Aldrich.
- Cloruro de potasio (KCl) (sigma) pureza 99,5%.
- Acetato de sodio (CH₃COONa) (Merk) pureza 99%.
- Folin–ciocalteu's phenol reagent, 2N, Sigma Aldrich.
- Carbonato de Sodio (Na₂CO₃) p.a. ISO. Scharlau.
- Metanol al 99% de pureza.
- Etanol al 99,99% Merck KGaA.
- 1,1-Diphenyl-1-picril-hydrayl (DPPH; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline – 6 ácido sulfónico) diammoniumsalt (ABTS; Sigma Aldrich, USA).
- Agua destilada desionizada (H₂O_{dd}).
- Persulfato de Potasio (K₂S₂O₈) p.a. Sigma Chemical.

3.4 Métodos de análisis

3.4.1 Cuantificación de polifenoles totales: Se realizó por el método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN CIOCALTEU, *et al.* (1927), reportado por (RADOJCIC *et al.*, 2009).

3.4.2 Cuantificación de antocianinas: Se realizó por el método del pH diferencial reportado por (POO, 2005).

3.4.3 Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

(DPPH): Se realizó por el método espectrofotométrico de luz visible a 517nm descrito por (BRAND *et al.*, 1995), reportado por (RADOJCIC *et al.*, 2009).

3.4.4 Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS+): Se realizó por el método descrito por (PELLIGRINI *et al.*, 1999).

3.5 Metodología experimental.

3.5.1 Muestreo.

El muestreo se realizó en los lotes de productos almacenados de la Planta Industrial de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo supervisado por el ingeniero de turno, el muestreo fue realizado de modo aleatorio cuyas muestras son grano, grano tostado, grano molido, licor de cacao, polvo de cacao y cocoa-vainilla todas ellas con una cantidad de 1000g independientemente.

3.5.2 Acondicionamiento de la muestra.

El muestreo se realizó en tres oportunidades, los análisis se realizaron después de cada muestreo. Las muestras fueron tomadas de las diferentes operaciones del proceso de elaboración de licor de cacao y polvo de cacao tal como se presenta en la Figura 6 y se detalla a continuación:

- **Recepción:** Los granos de cacao fermentados y secos fueron recepcionados con 7,5 – 10% de humedad en esta operación se tomó la muestra de granos y se denominó **T1 (MP)**.

- **Limpieza y selección:** Las almendras de cacao pasan por un tamiz en vibración quedando atrapados los granos cubiertos con mucilago, el polvo e impurezas, los granos livianos son aspirados por un ventilador extractor.

- **Torrefacción o tostado:** Esta operación se realiza a una temperatura de 80 - 100°C/ 30 - 45 min. reduciendo hasta una humedad 2,5 – 3,0%, en esta operación se realizó el segundo muestreo **T2 (TO)**.

- **Descascarillado:** En esta operación se elimina la cascarilla adherida en el grano tostado.

- **Molienda:** El grano procedente de la descascarilladora son sometidos a una presión entre 38 – 40MPa y temperatura entre 18 – 20°C en esta operación se realizó el muestreo **T3 (MO)**.

- **Homogenizado:** El licor de cacao obtenido es transportado a unos depósitos que están en constante agitación por espacio de 8 - 12 horas a la temperatura de 80 – 100°C y al mismo tiempo logrando la evaporación de la humedad hasta 1,5 – 1,8%. En esta operación se realizó el muestreo **T4 (LC)**.

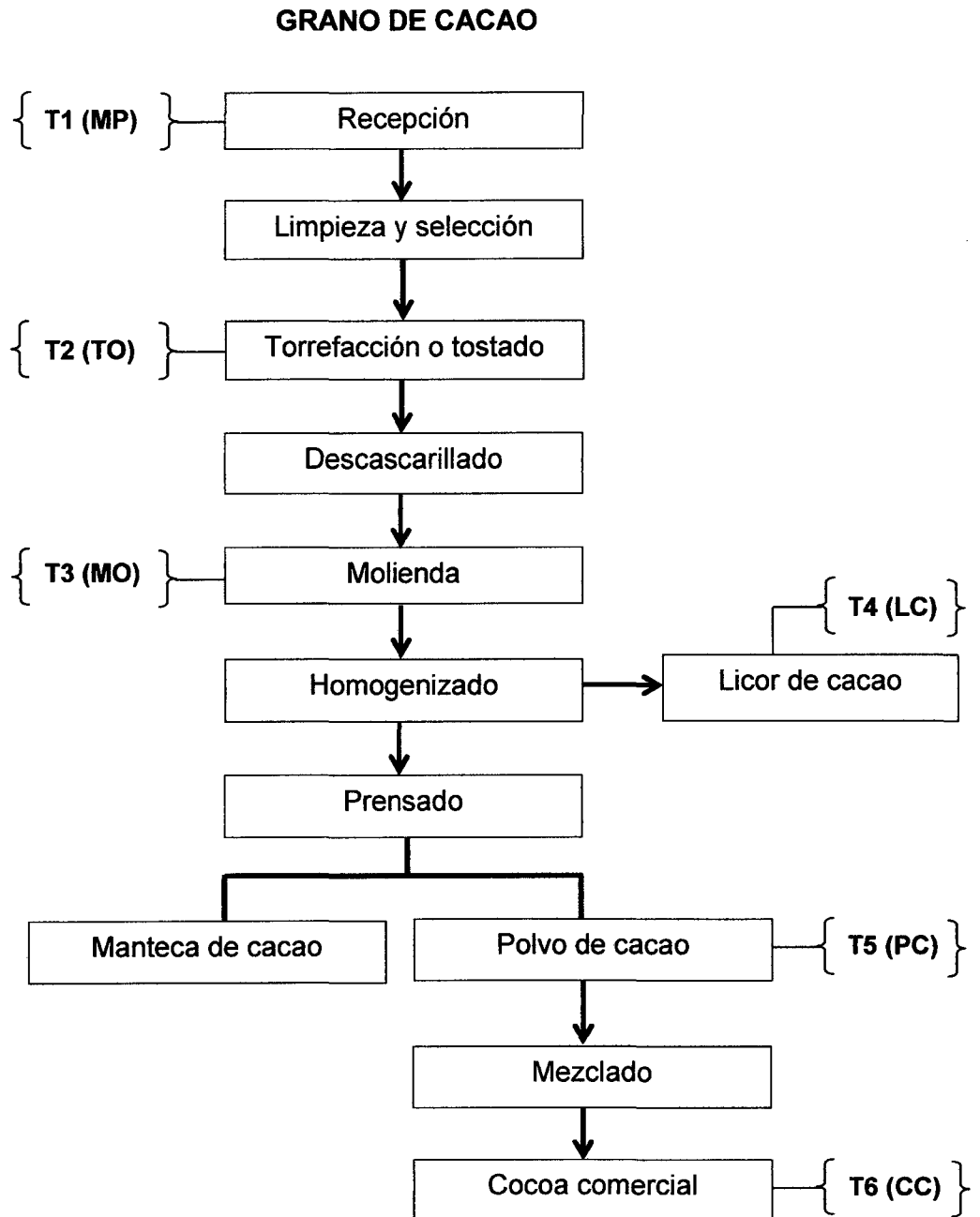


Figura 6. Muestreos realizados en el flujograma de obtención del licor de cacao y polvo de cacao.

- **Prensado:** Tiene como objetivo separar la manteca de cacao del licor de cacao; la operación se realiza a una temperatura de 95 a 100°C/30 min. a una presión de 480kg/cm². En esta operación se realizó el muestreo **T5 (PC)**.
- **Mezclado:** En esta operación se mezcla polvo de cacao, azúcar blanca refinada, maicena, canela y clavo de olor obteniéndose cocoas comerciales, este producto es el **T6 (CC)**.

3.5.3 Preparación del extracto hidroalcohólico.

Las operaciones realizadas para la preparación del extracto para cuantificación de polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante se muestran en la Figura 7.

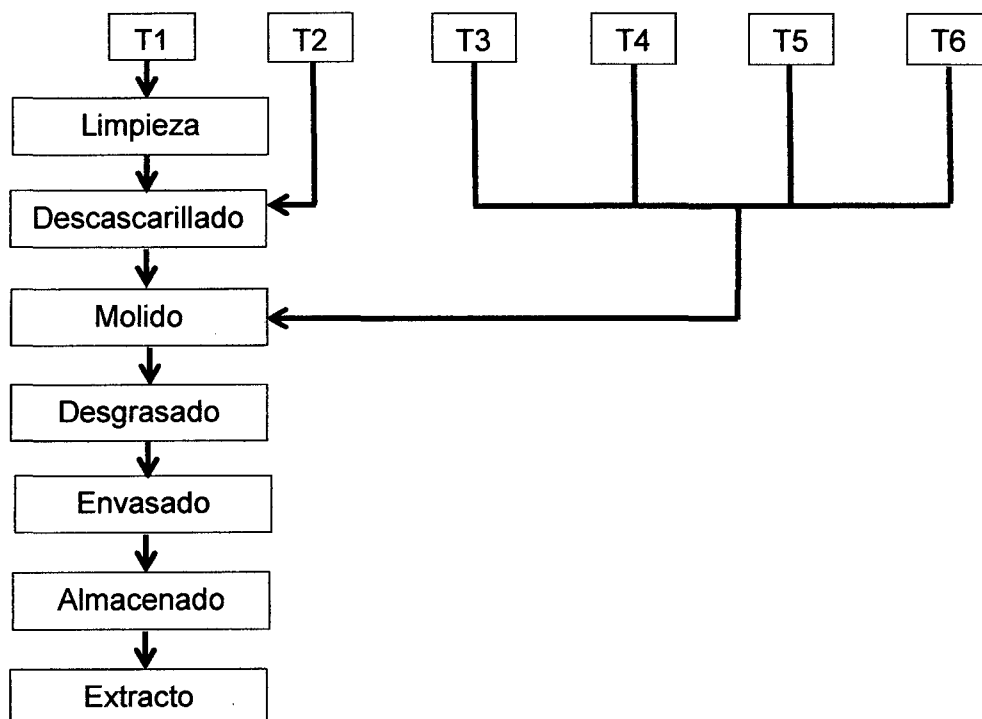


Figura 7. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.

- **Limpieza:** Solo la muestra de grano entero T1 se inició a partir de esta operación el cual se efectuó manualmente.
- **Descascarillado:** El tratamiento T2 provienen de la torrefacción; para realizar el extracto los granos de cacao fueron descascarillados de forma manual, para obtener la almendra.
- **Molido:** Los tratamientos T3, T4, T5, y T6 parten desde esta operación que tiene por finalidad de reducir el tamaño de partícula para facilitar el proceso de desgrasado, el cual se realizó en un molino helicoidal 5-20 micras.
- **Desgrasado:** El desengrasado se realizó por solvente en frío (Método Folch), que consistió en pesar 20 g 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 desengrasado 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 hidroalcohólico:** Se preparó el extracto hidroalcohólico de cacao a una concentración de 100 mg/mL, para ello se pesó 10 g de muestra desengrasada, el cual se transfirió a un frasco de vidrio de color ámbar, luego se adicionó 100 mL de solución hidroalcohólico (50:50 v/v), para luego taparlo herméticamente y macerarlo por 24 horas.

3.5.4 Cuantificación de polifenoles totales durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

3.5.4.1 Determinación de curva estándar

La curva estándar se realizó preparando una solución stock de 10mL de ácido gálico a una concentración de 2 mg/mL a partir de ello se hicieron las concentraciones siguientes: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 y 1,00 mg/mL, cada dilución se preparó por triplicado. Se agregó a cada tubo 1580 μ L de agua desionizada y 20 μ L de muestra control y estándares, se homogenizo ligeramente, luego se agregó 100 μ L de solución de fenol Folin Ciocalteu, se incubo por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizo la reacción agregando 300 μ L de Na_2CO_3 al 20% y finalmente se incubo por 2 horas a temperatura ambiente, para una completa reacción. Luego se realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm. Con los resultados obtenidos se hizo la gráfica concentración vs absorbancia, se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

3.5.4.2 Cuantificación de polifenoles totales.

La cuantificación de polifenoles totales de las muestras tomadas en cada etapa del proceso de licor de cacao y polvo de cacao se muestra en la Figura 8, se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (filtrado y centrifugado 10000rpm/10min a 4°C), a partir de ello se realizó la dilución de trabajo 5 mg/mL, 8 mg/mL y 10 mg/mL, para el 1er, 2do y 3er muestreo respectivamente con 5 repeticiones por tratamiento, cabe destacar que se adicione en los tubos para cada tratamiento 1580 μ L de agua destilada, 20 μ L de extracto diluido (5, 8 y 10 mg/mL), 100 μ L de fenol Folin Ciocalteu y finalmente 300 μ L de Na_2CO_3 al 20% y se incubo por 2 h a temperatura ambiente, luego se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700 nm.

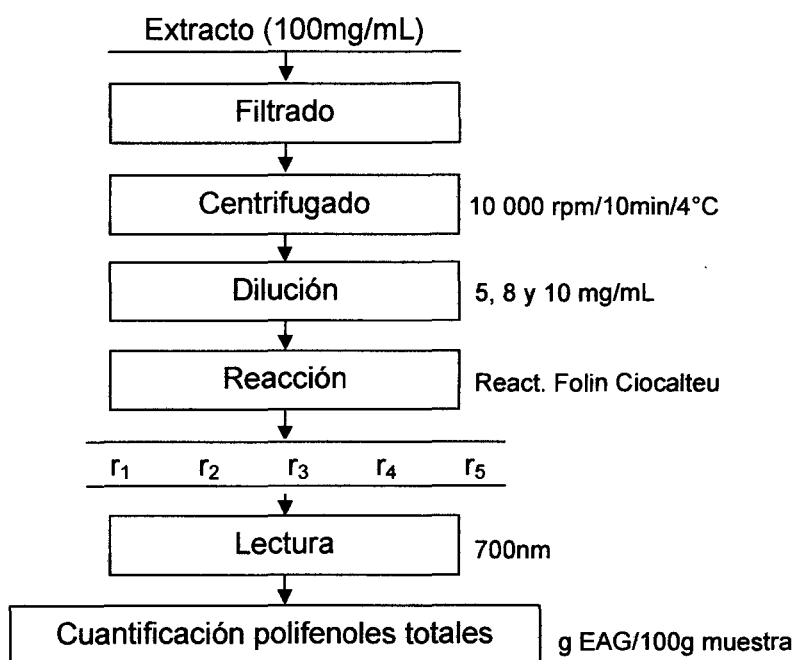


Figura 8. Esquema experimental para la cuantificación de polifenoles totales.

Las absorbancias obtenidas fueron remplazados 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) y diseño bloque completo al azar (DBCA) 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.

3.5.5 Cuantificación de antocianinas durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

3.5.5.1 Preparación de la solución buffer

Para la cuantificación de antocianinas primero se procedió a la preparación de las soluciones buffer.

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

Buffer pH = 4,5: 200 mL de 1 M CH₃COONa, 120 mL de 1M HCl y 180 mL de agua desionizada y aforarlo a 1 litro. Se aplicó la siguiente ecuación:

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

Dónde:

- C: Es la concentración de la antocianina expresada en mg/mL.
- 484,82: Es la masa molecular de la cianidina-3-glucósido.
- 24825: Es la absortividad molar a 510 nm, a pH = 1,0; pH = 4,5 es la corrección de la formación de productos de degradación.
- DF: Es el factor de dilución.

3.5.5.2 Procedimiento de análisis

Para la cuantificación de antocianinas se muestra en la Figura 9, se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL, filtrado y centrifugado 10000rpm/10min. a 4°C, se trabajó con 5 repeticiones por tratamiento, luego se hizo reaccionar con el buffer de pH 1 y pH 4,5 a 1 mL para posterior realizar la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 510 nm.

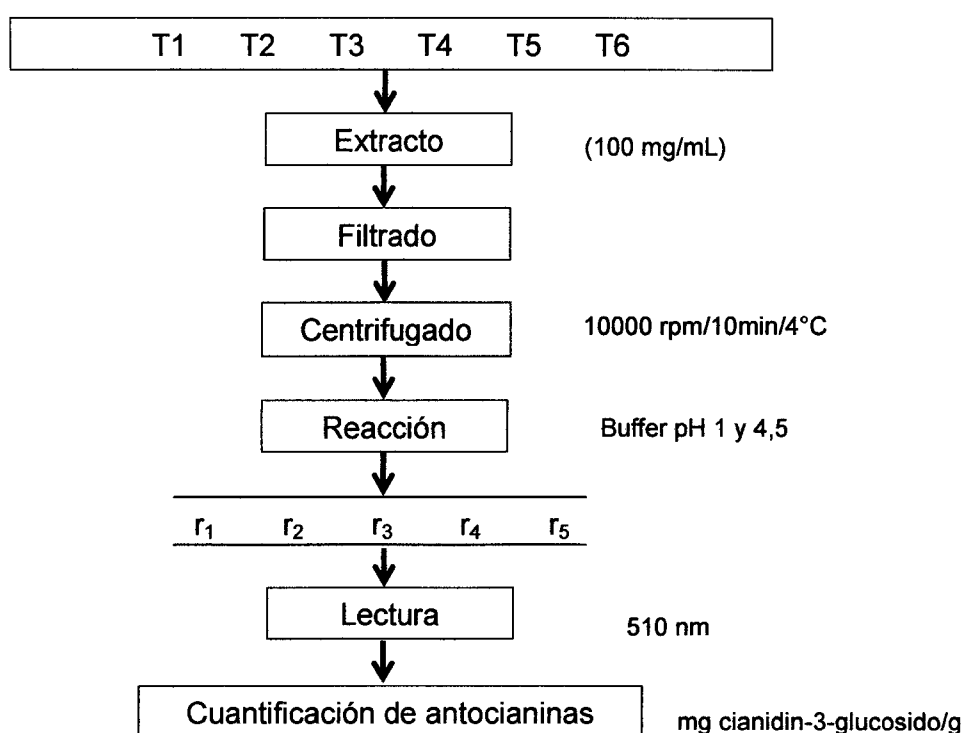


Figura 9. Esquema experimental para la cuantificación de antocianinas.

3.5.6 Determinar la actividad antioxidante durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

3.5.6.1 Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Para la determinación del coeficiente de inhibición del radical DPPH se siguió el procedimiento presentado en la Figura 10. Para ello se preparó 10 mL de solución stock de DPPH a 1mM en metanol al 99% de pureza, se agito hasta la solubilización completa del compuesto y se almaceno a 4°C protegido de la luz. A partir de esta solución stock se preparó 50 mL de DPPH a 20 μ M en metanol al 99% de pureza. Para la inhibición del radical DPPH en las distintas muestras se realizó el filtrado y centrifugado 10000rpm/10min. a 4°C, a partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 15, 30, 60, 120 μ g/mL. En el Cuadro 6 se describe el modo de operación que se siguió.

Cuadro 6. Preparación de soluciones de trabajo frente al radical DPPH.

Solución de trabajo (μ g/mL)	Extracto 100 mg/mL (μ L)	Solución hidroalcolica (μ L)	Volumen final (μ L)
15	6	994	1000
30	12	988	1000
60	24	976	1000
120	48	952	1000

Luego en una cubeta de poliestireno se adiciono 25 μ L de la solución trabajo y 975 μ L de solución DPPH a 100 μ M, se realizó la lectura en

un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 517 nm con un tiempo de 30 min. Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición DPPH} = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} \times 100$$

Dónde:

- A_c : Absorbancia de los controles.
- A_m : Absorbancia de la muestra en 30 min.

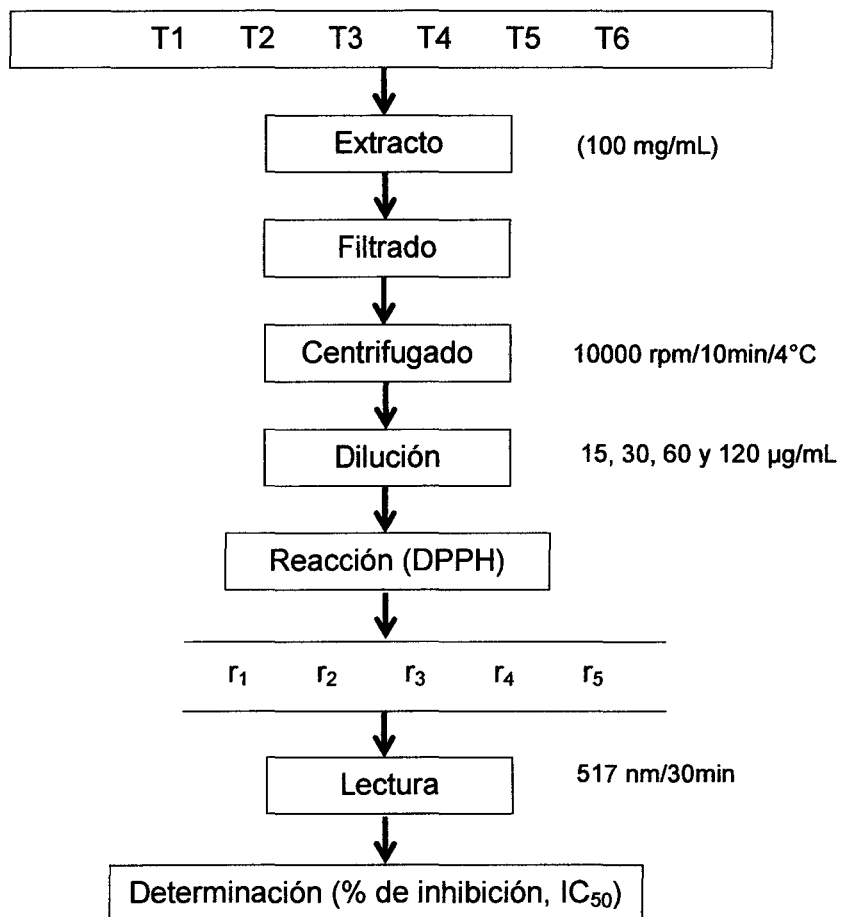


Figura 10. Esquema experimental para la determinación de la actividad antioxidante (radical DPPH).

3.5.6.2 Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis(3- etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS^{o+})

Para la determinación del coeficiente de inhibición del radical ABTS se siguió el procedimiento presentado en la Figura 11. Según la metodología desarrollada por PELLIGRINI *et al.* (1999) el radical ABTS^{o+} se forma tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (140mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16h. Una vez formado el radical ABTS^{o+} se diluyo con metanol hasta obtener un valor de absorbancia entre 0,7 a 1,2. Para la inhibición del radical ABTS en las distintas muestras se realizó el filtrado y centrifugado 10000rpm/10min. a 4°C, a partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 5, 40, 70, 95 µg/mL. En el cuadro 7 se describe el modo de operación que se siguió.

Cuadro 7. Preparación de soluciones de trabajo frente al radical ABTS.

Solución de trabajo (µg/mL)	Extracto 100 mg/mL (µL)	Solución hidroalcohólica (µL)	Volumen final (µL)
5	5	995	1000
40	40	960	1000
70	70	930	1000
95	95	905	1000

Luego en una cubeta de poliestireno se adicionó 10 µL de la solución de trabajo y 990 µL del radical ABTS. La disminución de la absorbancia se registró a 734 nm por espacio de 10 minutos.

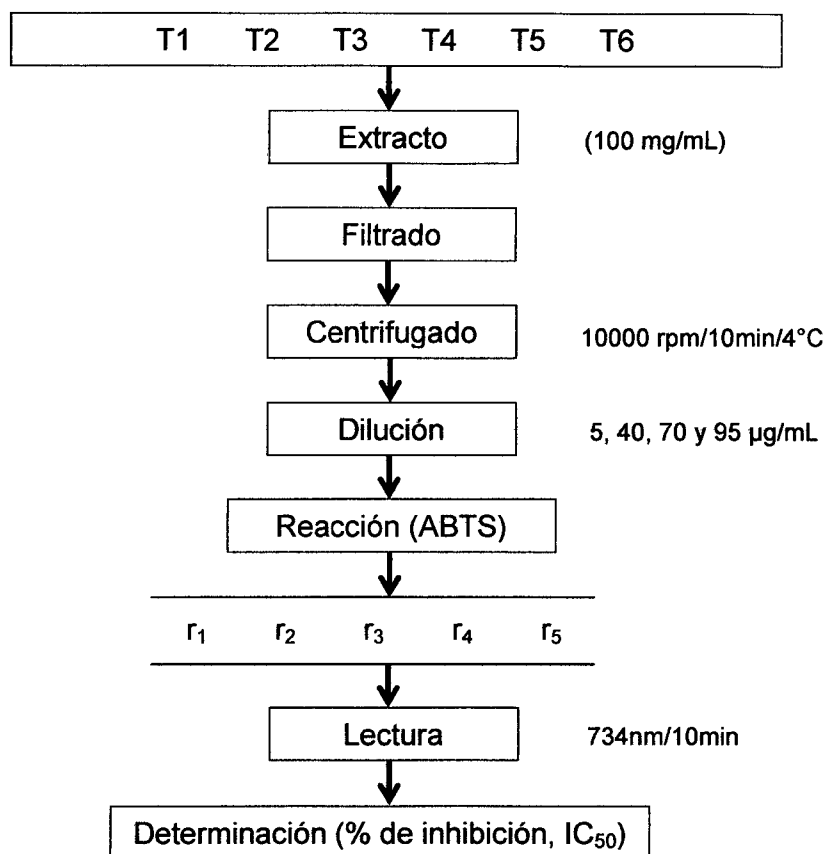


Figura 11. Esquema experimental para la determinación de la actividad antioxidante (radical ABTS).

El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición ABTS} = \frac{(A_c - A_m)}{A_c} \times 100$$

Dónde:

- A_c : Absorbancia de los controles.
- A_m : Absorbancia de la muestra en función del tiempo (10 min).

3.5.7 Análisis de multivariado - componentes principales

Es una técnica que intuitivamente sirve para hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia, en tal sentido para evaluar el comportamiento de los polifenoles totales, antocianinas, actividad antioxidante (DPPH y ABTS^{o+}) y poder reducir la dimensionalidad de los conjuntos de datos se utilizó el programa InfoStat versión 2011.

IV. RESULTADO Y DISCUSIONES

4.1 Cuantificación de polifenoles totales durante las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

4.1.1 Determinación de la curva patrón.

Para la cuantificación de polifenoles totales durante las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao 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 los Anexos A-Ia y A-Ib.

Para la curva estándar de polifenoles se utilizó ácido gálico tal como lo recomienda (SANDOVAL *et al.*, 2001) y BADUI (1988), indica que el ácido gálico tiene una fórmula $C_7H_6O_5$, PM 170,12. Por otro lado, ANDRIOLI (2000), 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 del A-Ib, la ecuación encontrada es de primer orden teniendo como variables "y" (absorbancia) 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 $R = 0,999$ indica que existe una relación positiva muy fuerte o casi perfecta esto concuerda con lo mencionado por (HERNÁNDEZ *et al.*, 2001), quienes indican que valores cercanos a 1 se considera ajustes casi perfectos.

4.1.2 Cuantificación de polifenoles totales en los diferentes lotes de muestreo.

El proceso a nivel industrial de los granos de cacao para la producción de licor y polvo de cacao se realizó por lotes a partir de granos de cacao procedente de los diferentes centros de acopio que cuenta la COPAIN, para poder determinar el margen de variación se trabajó con tres diferentes lotes, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 8 y Figura 12, en ella se puede apreciar que entre los lotes se encontró diferencia estadística significativa ($P \leq 0,05$) (A-IIa) según la comparación de los resultados mediante la prueba de tukey, los lotes 1 y 2 presentaron el mismo valor estadístico $5,406 \pm 0,202$ g EAG/100 g y $5,675 \pm 0,145$ g EAG/100 g y el lote de muestreo diferente fue el tercero $4,871 \pm 0,135$ g EAG/100 g.

Esta variación en el contenido de polifenoles puede ser explicado por PÉREZ *et al.*, (2006), que indican que la calidad está relacionada con el origen de las almendras, su fermentación, secado y tostado, así mismo influye el genotipo y la post cosecha.

Cuadro 8. Contenido de polifenoles totales en los diferentes lotes de muestreo.

Lote de muestreo	g EAG/100g de muestra
1ro	5,406 ± 0,202 ^a
2do	5,675 ± 0,145 ^a
3er	4,871 ± 0,135 ^b

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

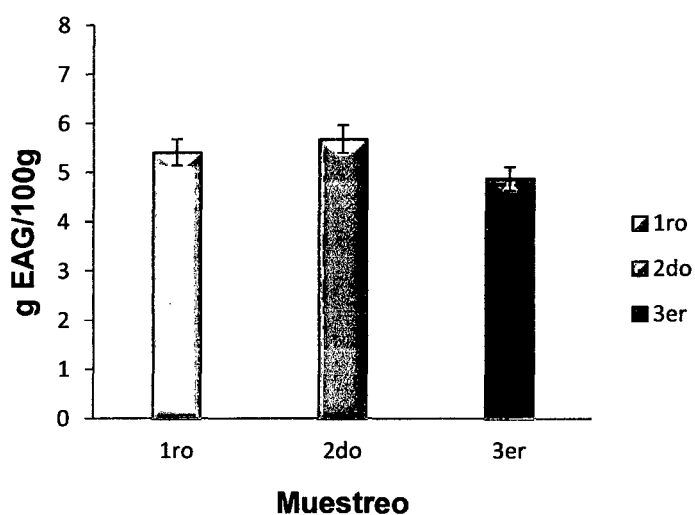


Figura 12. Representación del contenido de polifenoles totales en los diferentes lotes de muestreo.

Al igual ARLORIO *et al.*, (2008), mencionan que la presencia de polifenoles en el grano de cacao es dependiente de varios factores como la madurez, variedades de cacao, reacciones químicas, procesamiento, almacenamiento. Así como también la fermentación y el secado de granos de cacao y el tratamiento de poscosecha.

4.1.3 Cuantificación de polifenoles totales en las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

Los polifenoles son compuestos que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas considerados como metabolitos secundarios, estas moléculas son importantes para la fisiología de las plantas en tal sentido se realizó la cuantificación de polifenoles totales durante las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao se presenta en el Cuadro 9 y Figura 13, realizando el análisis estadístico entre los tratamientos se encontró diferencia significativa (A-IIb) y según la comparación entre las medias mediante tukey ($P \leq 0,05$) el mayor contenido de polifenoles totales fue para los granos $6,394 \pm 0,095$ g EAG/100 g de muestra y el menor correspondió a granos molidos $4,036 \pm 0,105$ g EAG/100 g de muestra.

De los resultados encontramos que el grano tuvo el mayor contenido de polifenoles totales comparado al resto de tratamientos según NIEMENAK *et al.*, (2006), los granos de cacao son una fuente rica en polifenoles, contribuyendo 12 a 18 % del peso seco, los polifenoles en los granos están asociados con el aroma y color del chocolate. Según AKITA *et al.*, (2008) y ROZAN *et al.*, (2007), los granos de cacao son consumidos como cocoas y chocolates y son considerados ricos en sustancias polifenolicas conteniendo procyanidinas que son los oligomeros de flavonoides particularmente el flavan-3-ol(-) epicatequina. LEE *et al.*, (2003), indican que la concentración de polifenoles en las semillas de cacao secas y libres de grasa oscila entre el 15 -

20. % (p/p) y están constituidos por un 37% de catequinas, 4% de antocianinas y 58% de proantocianidinas.

Según TOMÁS *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/100 g, 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/100g, y Perú variedad Criollo 5 g EAG/100 g.

Cuadro 9. Cuantificación del contenido de polifenoles totales en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

Muestras	Tratamientos	g EAG/100 g de muestra
Grano	T ₁	$6,394 \pm 0,095^a$
Grano tostado	T ₂	$5,081 \pm 0,287^b$
Grano molido	T ₃	$4,036 \pm 0,105^c$
Licor de cacao	T ₄	$5,689 \pm 0,153^b$
Polvo de cacao	T ₅	$5,508 \pm 0,132^b$
Cocoa-vainilla	T ₆	$5,197 \pm 0,138^b$

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

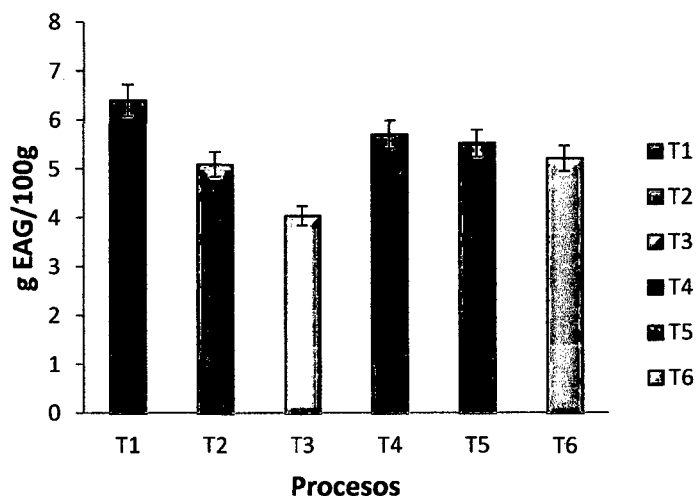


Figura 13. Representación del contenido de polifenoles totales en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

CONDEZO (2011), determinó que existe variación en el contenido de polifenoles según la calidad de los granos comerciales procedentes de la ciudad de Tingo María y Tocache $6,220 \pm 0,08$ g EAG/100 g y $4,150 \pm 0,07$ g EAG/100 g respectivamente. Asimismo HUANCA (2010), en su trabajo respecto a la cuantificación de polifenoles en granos de cacao criollo y CCN-51, reportó $7,597 \pm 0,011$ g EAG/100 g y $7,547 \pm 0,038$ g EAG/100 g respectivamente; como podemos apreciar los resultados reportados por otros autores se enmarcan con los encontrados en la investigación.

Comparando los resultados según las etapas de proceso entre el grano y granos tostado podemos apreciar que el tostado afecta el contenido de polifenoles totales en un 20,5% (grano sin tostar $6,394 \pm 0,095$ g EAG/100 g de muestra y grano tostado $5,081 \pm 0,287$ g EAG/100 g de muestra) al respecto ARLORIO *et al.*, (2008), reporta pérdidas durante el proceso de pre tostado

100°C y tostado 130°C está en un rango de 32,6 a 54,7%, atribuyendo esta tendencia al efecto de la temperatura y a la posible formación de otros compuestos en la reacción de Maillard.

BRITO *et al.*, (2000), encontró que el contenido de polifenoles totales decrece 57% después del tostado de granos de cacao sometidos a 150°C /30 minutos. Así mismo, el tostado hace decrecer el contenido de flavanol (STAHL *et al.*, 2009).

HUANCA (2010), en su trabajo respecto a la cuantificación de polifenoles en granos de cacao tostado criollo y CCN-51, reporto $7,441 \pm 0,045$ g EAG/100 g y $7,332 \pm 0,035$ g EAG/100 g respectivamente.

Según OLIVIERO *et al.*, (2009), mencionan que durante el tostado sucede la oxidación, condensación de compuestos complejos de polifenoles debido a la reacción de Maillard y este es responsable del color pardo, aroma agradable y textura. Además los compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes son rápidamente disminuidos durante el tostado.

Comparando el contenido de polifenoles entre el grano y grano molido tenemos que el contenido de polifenoles decreció en 36,88% (grano $6,394 \pm 0,095$ g EAG/100 g de muestra y grano molido $4,036 \pm 0,105$ g EAG/100 g de muestra). Según BRAUDEAU (1981), la molienda consiste en desmenuzar los granos de cacao a una temperatura de 50-70°C modo a obtener por fusión de la manteca, una pasta fluida cuya finura es una de las condiciones de la calidad de los productos. Así mismo, la operación de tostado y fraccionamiento causa reducción en el contenido de flavanol y procianidinas (STAHL *et al.*, 2009).

Del Cuadro 9 y Figura 13, respecto al licor de cacao podemos apreciar que el contenido comparado al grano molido aumenta en esta operación (grano molido $4,036 \pm 0,105$ g EAG/100 g de muestra y licor de cacao $5,689 \pm 0,153$ g EAG/100 g de muestra), al moler los trozos de cacao se convierte en licor de cacao, en esta etapa las paredes celulares se destruyen y el calor de fricción que se desarrolla por la molienda funde los glóbulos de grasa, los cambios en su mayoría son físicos incluyendo la eliminación de agua, el licor debe molerse a suficiente finura para desprender la grasa y debe ser lo bastante grueso para no causar dificultades en el prensado (DESROSIER, 1985).

OTHMAN *et al.*, (2007), reporta que el contenido de polifenoles en licor de cacao varía de acuerdo al país de origen. El contenido de polifenoles en productos derivados del cacao depende de varios factores, incluyendo la variedad de grano, manejo de poscosecha, fermentación, secado y tostado (STAHL *et al.*, 2009).

RADOJCIC *et al.*, (2009), reporta en diferentes muestras de licor de cacao Ecuador $8,14 \pm 0,13$ g EAG/100 g de muestra, Ghana $4,01 \pm 0,04$ g EAG/100 g de muestra, Madagascar $12,65 \pm 0,31$ g EAG/100 g de muestra, México $8,37 \pm 0,15$ g EAG/100 g de muestra, Sao Tome $4,92 \pm 0,13$ g EAG/100 g de muestra y Venezuela $5,19 \pm 0,19$ g EAG/100 g de muestra, el mismo autor indica que la composición del licor de cacao depende de la variedad de grano de cacao, de los procesos de la poscosecha y condiciones de tostado.

NATSUME *et al.*, (2000), reportan en diferentes muestras de licor de cacao Ecuador 4,11 g ECAT/100 g, Venezuela 1,55 g ECAT/100 g, Ghana 2,93

g ECAT/100 g, Colombia 1,20 g ECAT/100 g, Costa de Marfil 3,13 g ECAT/100 g y Brasil 6,04 g ECAT/100 g.

Del mismo cuadro y figura, podemos indicar que entre las muestras de polvo de cacao y cocoa-vainilla no existe diferencia estadística pero si existe diferencia numérica siendo mayor el contenido de polifenoles totales en polvo de cacao $5,508 \pm 0,132$ g EAG/100 g y cocoa-vainilla $5,197 \pm 0,138$ g EAG/100 g de muestra.

Según STAHL *et al.*, (2009), el polvo de cacao es hecho a partir del grano de cacao finamente molido al cual se le ha removido la manteca de cacao resultando un polvo con típicamente 88 a 90% sólidos no grasos y 10 a 12 % de grasa y ésta es una fuente muy rica de procianidinas.

Los flavanoles residen en la porción sólida no grasa del grano el cual comprende alrededor del 47% del grano y el remanente está en la manteca de cacao (STAHL *et al.*, 2009).

PORTER *et al.*, (1991), reporta un contenido total de polifenoles en el polvo de cacao, según lo estimado por el ensayo de Folin Ciocalteu $5,624$ g EAG/100 g de muestra. MILLER *et al.*, (2009), reporta en tres muestras de cacao en polvo CP-1 $6,020 \pm 4,54$, CP-2 $4,530 \pm 1,16$ y CP-3 $5,170 \pm 0,57$ g EAG/100 g de muestra, los resultados reportados en la investigación se encuentran dentro del rango publicado.

NATSUME *et al.*, (2000), reporta en diferentes muestras de polvo de cacao Ecuador 3,02 g ECAT/100 g, Venezuela 3,50 g ECAT/100 g, Ghana 3,45 g ECAT/100 g, Colombia 3,42 g ECAT/100 g, Costa de Marfil 4,54 g ECAT/100 g y Brasil 4,73 g ECAT/100 g.

En general de todos los resultados los polifenoles son afectados por el genotipo, origen geográfico, método de fermentación y tamaño de poda STAHL *et al.*, (2009). Así mismo, KOWALSKA y SIDORCZUK (2007), la variación del contenido y composición de polifenoles durante la producción de chocolate (tostado, descascarado, molienda) son afectados por el uso de altas temperaturas en presencia de oxígeno provocando procesos oxidativos.

4.2 Cuantificación de antocianinas durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

4.2.1 Cuantificación de antocianinas en los diferentes lotes de muestreo.

Las antocianinas pertenecen a un gran y muy distribuido grupo de metabolitos secundarios, que se conocen colectivamente como flavonoides, las antocianinas son los responsables de colores para muchas frutas y flores, además es de gran interés debido a su potencial uso como colorantes naturales, y sus potenciales beneficios en la salud.

Al igual que el análisis de polifenoles totales y capacidad antioxidante se trabajó con tres diferentes lotes, para poder determinar el margen de variación, cuyos resultados se muestran en el Cuadro 10 y Figura 14, en ella se puede apreciar que entre los lotes se encontró diferencia estadística significativa ($P \leq 0,05$) (A-IIIa) según la comparación de los resultados mediante la prueba de tukey, los lotes 1 y 2 presentaron el mismo valor estadístico $0,419 \pm 0,101$ mg cianidina-3-glucósido/g de muestra y $0,404$

$\pm 0,099$ mg cianidina-3-glucósido/g de muestra y el lote de muestreo diferente fue el tercero $0,332 \pm 0,078$ mg cianidina-3-glucósido/g de muestra.

Cuadro 10. Contenido de antocianinas totales en los diferentes lotes de muestreo.

Lote de muestreo	mg cianidina-3-glucósido/g de muestra
1ro	$0,419 \pm 0,101^a$
2do	$0,404 \pm 0,099^a$
3er	$0,332 \pm 0,078^b$

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

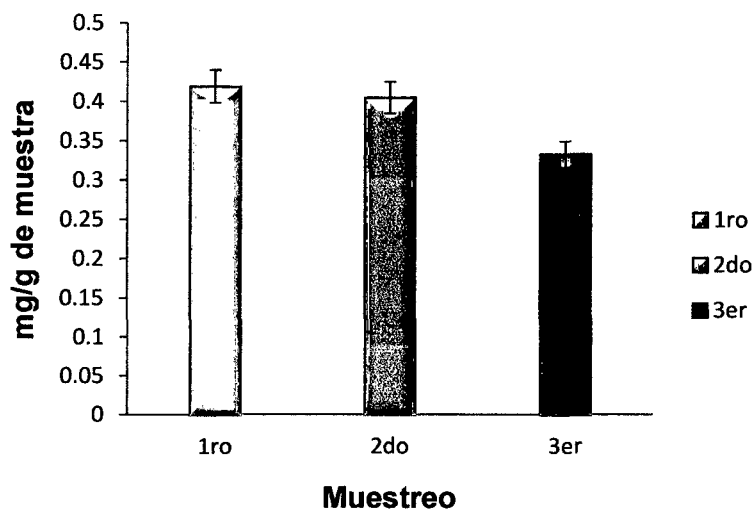


Figura 14. Representación del contenido de antocianinas en los diferentes lotes de muestreo.

La diferencia estadística encontrada en los lotes puede deberse lo reportado por RADOJCIC *et al.*, (2009), que indican que en el proceso de

elaboración de licor de cacao, cocoa y chocolates se combinan granos en varias proporciones con especificaciones económicas y estándares de calidad que son los responsables del aroma y propiedades funcionales de los productos.

Por otro lado según los resultados se puede aducir que el menor contenido de antocianinas encontrado en el tercer muestreo ($0,332 \pm 0,078$ mgcianidina-3-glucósido/g de muestra) puede deberse a que los granos habrían sido sometidos a procesos de fermentación más prolongada y secado no adecuado tal como lo indica (CUBERO *et al.*, 1992).

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), indican 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.

4.2.2 Cuantificación de antocianinas en las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

En el Cuadro 11 y Figura 15 se presenta los resultados de las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao, observado los resultados podemos indicar que entre los tratamientos existió diferencia estadística significativa (A-IIIb), realizando la comparación de los promedios

mediante tukey ($P \leq 0,05$), se tiene que el mayor contenido de antocianinas fue en el grano $1,49 \pm 0,043$ mg cianidina-3-glucósido/g de muestra al respecto NIEMENAK *et al.*, (2006) indican que los granos frescos de cacao contiene pigmentos de antocianinas de color purpura, cianidins-3- β -galactosyl y cianidins-3- α -L-arabinosyl y durante la fermentación estos pigmentos son hidrolizados por glucosidos resultando un cambio del cotiledón de violeta a marrón.

Así mismo, CUBERO *et al.*, (1992), reportó sobre el proceso de fermentación en granos sin fermentar 12 mg cianidina-3-glucósido/g y 1,72 mg cianidina-3-glucósido/g en almendras fermentadas, según la información reportada, podemos decir que las antocianinas se degradan durante el proceso de fermentación, el contenido de antocianinas reportado por el autor se encuentra dentro del rango determinado en la investigación, sin embargo es posible que el contenido de dicha antocianina se vea influenciado por la concentración de granos pizarrosos y violetas que se muestra en el anexo A-VIIIa.

Durante el proceso de tostado el contenido de antocianinas disminuyó en 91,8% comparando al grano sin tostar, esto puede deberse a que en el proceso de tostado los granos son sometidos a 100-120°C/20-30 minutos hasta obtener una humedad de 1,5%. Según MONTES (1981), manifiesta que en el tostado de las almendras se desarrollan las características sensoriales y que al mismo tiempo se reduce la humedad a un nivel 1,2% para que la cascara quede apto para ser separado del cotiledón. ASTRID (2008), indica que el incremento de la temperatura provoca la pérdida del azúcar

glicosilante en la posición 3 de la molécula de apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras.

Cuadro 11. Cuantificación del contenido de antocianinas en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

Etapas de proceso	Tratamientos	mg cianidina-3-glucósido/g de muestra
Grano	T ₁	1,490 ± 0,043 ^a
Grano tostado	T ₂	0,122 ± 0,013 ^{dc}
Grano molido	T ₃	0,074 ± 0,003 ^d
Licor de cacao	T ₄	0,162 ± 0,007 ^c
Polvo de cacao	T ₅	0,279 ± 0,017 ^b
Cocoa-vainilla	T ₆	0,182 ± 0,017 ^c

Los valores representan (promedio ± SEM) datos provienen del experimento (n=5) valores de la misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

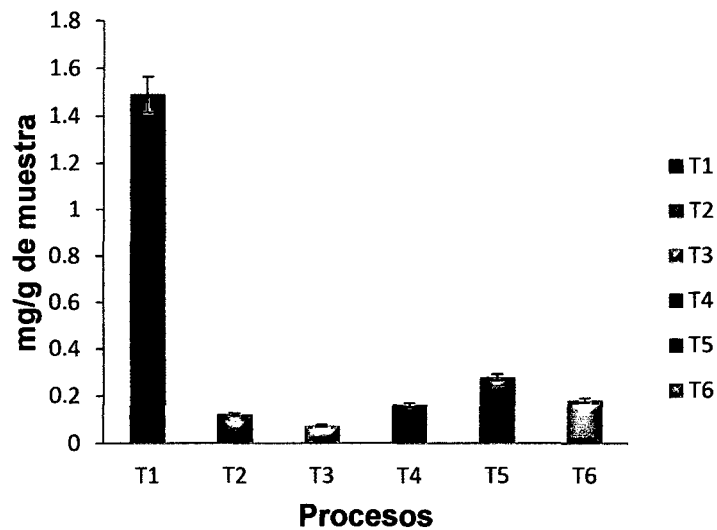


Figura 15. Representación del contenido de antocianinas en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

Comparando todos los tratamientos el menor contenido de antocianinas correspondió al grano molido $0,074 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g, comparando este resultado con el grano tostado este ha perdido 39,3% de antocianinas, al respecto podemos indicar que en esta operación la molienda se realizó 70-80°C hasta obtener una finura 97-99%. BRAUDEAU (1981), indica que la molienda consiste en desmenuzar los granos de cacao a una temperatura de 50-70°C modo a obtener por la fusión de la manteca una pasta fluida cuya finura es una de las condiciones de la calidad de los productos. Este comportamiento de pérdida de antocianina puede ser explicado por DESROSIER (1985), que menciona que al moler los trozos de cacao se convierten en licor de cacao donde las paredes celulares se destruyen y el calor de fricción que se desarrolla por la molienda funde los glóbulos de grasa. Así mismo CERON (2008), indica que las antocianinas son muy inestables y se degradan ante algunos factores como la temperatura ya que no deben exceder los 40 °C.

El licor de cacao y cocoa-vainilla estadísticamente son los que tuvieron un contenido de antocianinas similares. Para el licor de cacao el contenido fue $0,162 \pm 0,017$ mg cianidina-3-glucósido/g, esto puede deberse a lo reportado por DESROSIER (1985), que indica que en la molienda ocurren cambios físicos y químicos, pues se elimina el agua, se da la afirmación del sabor y la rotura de las células de grasa. Con respecto a la cocoa-vainilla el contenido fue $0,182 \pm 0,017$ mg cianidina-3-glucósido/g. Al respecto PEREA *et al.*, (2009), indican que en productos como chocolate con azúcar, chocolate con clavo y canela, y sucedáneo de cacao presentan valores inferiores en el

contenido de polifenoles esto puede ser debido a que estos productos son fabricados con cocoa y grasa vegetal y tienen aproximadamente 30% de licor de cacao.

Del Cuadro 11, el mayor contenido de antocianinas se encontró en el grano de cacao ($1,490 \pm 0,043$ mg cianidina-3-glucósido/g) y el menor fue grano molido ($0,074 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g), comparando estos resultados con el reporte de BENAVIDES (2012), en el fruto de unguirahui en madurez comercial se encontró a las 0 h ($0,317$ mg Cy 3 glu/g) y el menor fue entre las 35 a 42 h ($0,07$ y $0,730$ mg Cy 3 glu/g). DEL CARPIO *et al.* (2009), reporto en cheqche (*Berberisboliviana* Lechler) $1,50$ mg Cy 3 glu/g. LEYVA (2009), reporta en el género *Rubus* de $0,10$ a $6,0$ mg Cy 3 glu/g. SALINAS *et al.*, (2005), en frejol negro raza Jalisco $0,37$ mg Cy 3 glu/g y en raza Mesoamérica $0,50$ mg Cy 3 glu/g y AGUILERA (2009), en higo reporta $0,162$ mg Cy 3 glu/g.

4.3 Determinación de la capacidad antioxidante del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH).

4.3.1 Coeficiente de inhibición IC_{50} en los diferentes lotes de muestreo.

Los antioxidantes contribuyen al mantenimiento de la salud humana protegiendo al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos. Los resultados del IC_{50} del radical DPPH en los diferentes lotes de muestreo se presentan en el Cuadro 12 y Figura 16, como

podemos apreciar entre los tratamientos se encontró que no existe diferencia significativa (A-IVa) esto indica que en las tres veces que se realizó el muestreo los resultados variaron IC_{50} $53,044 \pm 0,507$ a $54,029 \pm 0,442$ $\mu\text{g/mL}$, en los tres lotes los puntos muestreados fueron grano, grano tostado, grano molido, licor de cacao, polvo de cacao y cocoa con vainilla.

Cuadro 12. Resultados del IC_{50} del radical DPPH en los diferentes lotes de muestreo.

Lote de muestreo	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
1ro	$53,044 \pm 0,507^a$
2do	$53,344 \pm 0,445^a$
3er	$54,029 \pm 0,442^a$

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

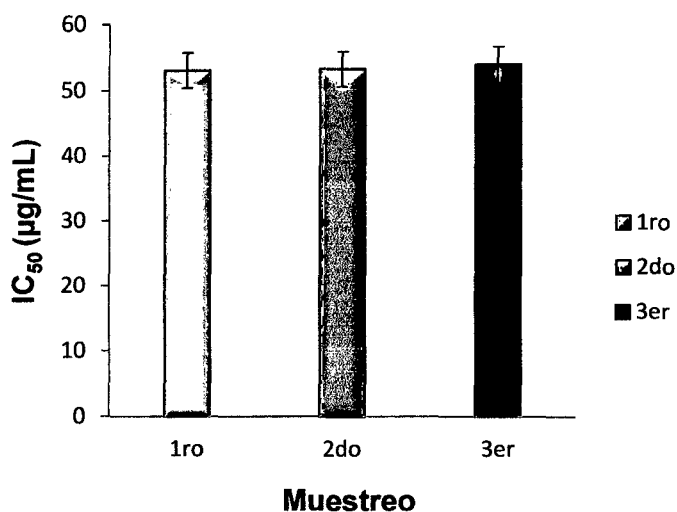


Figura 16. Comportamiento del IC_{50} con el radical DPPH en los diferentes lotes de muestreo.

Al respecto NIEMENAK *et al.*, (2006), indican que los productos de chocolatería se preparan a partir de granos selectos y combinados que cumplan la certificación de los estándares de calidad y especificación económica. CONDEZO (2010), evaluó la capacidad antioxidante mediante el radical DPPH en granos de cacao comercial buenos y defectuosos en Tingo María y Tocache, reporto para granos buenos IC_{50} $51,310 \pm 0,47$ a $80,887 \pm 0,62$ $\mu\text{g/mL}$ y en granos defectuosos IC_{50} $58,420 \pm 0,64$ a $85,380 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de la investigación se encuentran dentro de estos datos reportados.

CIENFUEGOS *et al.*, (2009), manifiestan que la capacidad antioxidante varía según la variedad botánica, factores de manufactura, tales como manejo de poscosecha, fermentación, secado, tostado y tratamiento de alcalinización.

AIKPOKPODION y DONGO (2010), indican que la capacidad antioxidante está dada por los polifenoles totales, monómero flavonol (epicatequina y catequina) y proantocianinas, estos compuestos son considerados como candidatos potenciales para combatir los radicales libres.

4.3.2 Coeficiente de inhibición IC_{50} en las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

En el Cuadro 13 y Figura 17, se presenta los resultados del IC_{50} comparando las diferentes etapas de proceso podemos indicar que se encontró diferencia estadística significativa (A-IVb), comparando mediante la prueba de tukey ($P \leq 0,05$), podemos indicar que la mayor capacidad antioxidante se

encontró en las etapas de grano molido (IC_{50} 51,158 \pm 0,117 $\mu\text{g/mL}$), grano (IC_{50} 52,318 \pm 0,085 $\mu\text{g/mL}$), polvo de cacao (IC_{50} 52,743 \pm 0,528 $\mu\text{g/mL}$) y licor de cacao (IC_{50} 52,930 \pm 0,340 $\mu\text{g/mL}$).

Como podemos apreciar en el cuadro el grano tuvo buena actividad antioxidante, según CIENFUEGOS *et al.*, (2009), cita que un 90% decae en la concentración de epicatequina después de la fermentación y secado. Decrecimiento significativo del contenido de flavonoides después del proceso de fermentación, también decrecen 3 - 5 veces los niveles de procianidinas durante la fermentación.

HUANCA (2010), reportó en granos de cacao criollo IC_{50} 43,041 \pm 0,16 $\mu\text{g/mL}$ y en CCN-51 IC_{50} 52,493 \pm 0,29 $\mu\text{g/mL}$. ARLORIO *et al.*, (2008), reporta en extracto metanólico en cacao no fermentado de Ghana IC_{50} 30,100 \pm 2,41 $\mu\text{g/mL}$, cacao de Ecuador no fermentado IC_{50} 14,986 \pm 2,41 $\mu\text{g/mL}$ y cacao de Costa de Marfil no fermentado IC_{50} 20,748 \pm 3,566 $\mu\text{g/mL}$. OTHMAN *et al.*, (2007), reporta en granos de cacao IC_{50} (DPPH) en extracto etanólico en granos de Malasia 1,3 mg/mL y en extracto acuoso 2,4 mg/mL. Comparando con los resultados encontrados en el grano (IC_{50} 52,318 \pm 0,085 $\mu\text{g/mL}$) y los reportes citados existe variación esto puede aducirse que se debe a 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 (NIEMENAK *et al.*, 2006).

Cuadro 13. Resultados del IC₅₀ del radical DPPH en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

Etapas de proceso	Tratamientos	IC ₅₀ (µg/mL)
Grano	T ₁	52,318 ± 0,085 ^b
Grano tostado	T ₂	55,986 ± 0,599 ^a
Grano molido	T ₃	51,158 ± 0,117 ^b
Licor de cacao	T ₄	52,930 ± 0,340 ^b
Polvo de cacao	T ₅	52,743 ± 0,528 ^b
Cocoa-vainilla	T ₆	55,700 ± 0,805 ^a

Los valores representan (promedio ± SEM) datos provienen del experimento (n=5) valores de la misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

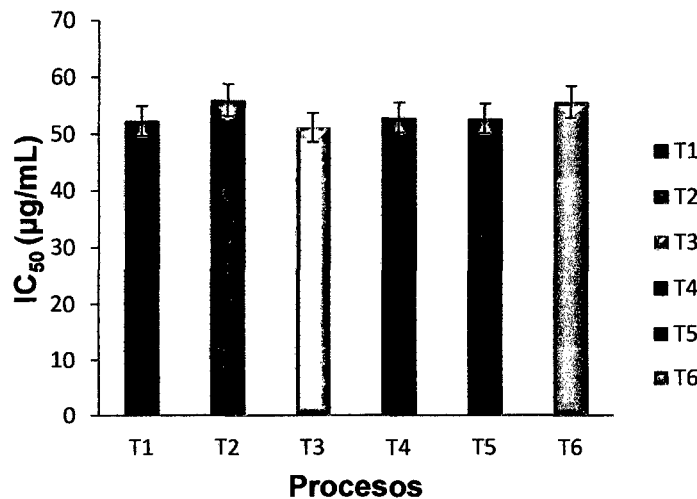


Figura 17. Comportamiento del IC₅₀ con el radical DPPH en las diferentes etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

Según los resultados el grano molido tuvo la mayor capacidad antioxidante numéricamente (IC₅₀ 51,158 ± 0,117 µg/mL), esto puede deberse

a lo reportado por OVACO y PINEDA (2011), que indican que las muestras molidas y tamizadas con mallas entre 460 a 600 μm tuvieron mejor valor de capacidad antioxidante. Así mismo, TOVAR DE DIOS (2001), indica que la molienda afecta el color, aceite y los compuestos fenólicos relacionando con el rompimiento de la piel y existe mayor liberación de fitoquímicos en el caso de aceitunas. Comparando el análisis del DPPH con el de los polifenoles totales el valor obtenido en ellos es diferente y contradictorio este comportamiento puede ser aclarado por OTHMAN (2007), quien sugiere que la habilidad alta del DPPH no necesariamente se debe a los fenoles en extractos de cacao.

El IC_{50} del licor de cacao ($52,930 \pm 0,340 \mu\text{g/mL}$) fue estadísticamente igual al grano entero, grano tostado molido y polvo de cacao, Según RADOJCIC *et al.*, (2009), en licor de cacao reporta flavan-3-ols, (-)-epicatequina (0,16 a 0,59 mg/g DCL), (+)-catequina (0,02-0,42 mg/g DCL) en todas las muestras, (-)-Galatocatequina no se encontró en muestras de Ghana y Venezuela, mientras (-)-Epigalocatequina no se detectó en licor de México y Venezuela, los contenidos de (-)-epigalocatequina en las muestras de Ghana y Ecuador fueron similares, mientras que en Madagascar y Sao Tome fueron más altos. Todo el contenido de polifenoles en licor de cacao quedó ordenado de la siguiente manera: Madagascar, México, Ecuador, Venezuela, Sao Tome y Ghana, comparando las 6 muestras de licor de cacao la composición de polifenoles fue similar en cambio la cantidad de polifenoles individual fue marcadamente diferente. El mismo autor determinó que la capacidad antioxidante está relacionado con el contenido de polifenoles reportan una correlación de $R^2=0,9868$ de DPPH.

NATSUME *et al.*, (2000), en el licor de cacao reporta con muestras de diferentes países un contenido de polifenoles, Brasil 6,04 g ECAT/100 g, y el menor fue para Colombia 1,20 g ECAT/100 g.

Del Cuadro 13 y Figura 17 el polvo de cacao también tuvo buena capacidad antioxidante IC_{50} $52,743 \pm 0,528 \mu\text{g/mL}$, comparando este resultado con licor de cacao fueron similares estadísticamente, Al respecto Hill *et al.*, (2009), compara la capacidad antioxidante de productos de chocolatería, licor de cacao IC_{50} DPPH 1,68 mg/mL, el polvo de cacao 7,11 mg/mL y en chocolate con leche 17,31 mg/mL; como podemos apreciar el licor tuvo el mayor valor pero en el chocolate la capacidad antioxidante decae.

Del Cuadro 13 y Figura 17, se puede apreciar que los tratamientos referidos a grano tostado y cocoa-vainilla fueron estadísticamente similares y tuvieron la menor eficiencia frente al radical DPPH comparado a los otros tratamientos. En los granos de cacao tostado se reportó IC_{50} $55,986 \pm 0,599 \mu\text{g/mL}$ sobre este valor MILLER *et al.*, (2009), indican que la capacidad antioxidante puede ser afectada por muchos factores como el tostado, proceso de fermentación por que en estas etapas decrece el contenido de flavonol en los granos de cacao. OVACO y PINEDA (2011), indican que durante el secado de los granos de cacao se reduce la cantidad de sustancias con propiedades antioxidativas principalmente por reacciones enzimáticas, así mismo, el proceso de tostado es responsable de reducir el amargor y sabores de los granos que son responsables de la calidad del producto final. OLIVIERO *et al.*, (2009), indican que el tostado de los granos afecta a los compuestos fenólicos con propiedad antioxidante disminuyendo rápidamente, por que sucede una

oxidación, condensación de compuestos fenólicos que son responsables de las características de color pardo, aroma y textura de los granos.

HUANCA (2010), reportó en granos tostado criollo IC_{50} 47,437 $\mu\text{g/mL}$ y catequina 545, 336 mg CAT/kg y en CCN-51 IC_{50} 52,716 $\mu\text{g/mL}$ y catequina 654,046 mg CAT/kg. Comparando con nuestros resultados estos datos tienen semejanza.

Con respecto a la cocoa-vainilla tuvo un valor de IC_{50} 55,700 $\mu\text{g/mL}$, como indicamos se puede apreciar que existe menor eficiencia frente al radical DPPH, Según Hill *et al.*, (2009), en polvo de cacao reporta un IC_{50} 1,68 mg/mL, en chocolate negro IC_{50} 7,04 mg/mL, en chocolate con leche IC_{50} 17,31 mg/mL como podemos apreciar cuando se trabaja productos de chocolatería la capacidad antioxidante disminuye considerablemente tal como sucedió en nuestro caso cuando se compara con el polvo de cacao esta disminuyo 5,6%.

NATSUME *et al.*, (2000), reporta en muestras de Brasil 4,73 g ECAT/100 g de polifenoles en polvo de cacao y en chocolate oscuro 1,71 g ECAT/100 g, como se puede apreciar en este caso el contenido de polifenoles también disminuye.

En general los resultados del Cuadro 13, muestran que en cada etapa de proceso la capacidad antioxidante varia, según KUSKOSKI *et al.*, (2005), indican que la capacidad antioxidante de una mezcla no viene dado solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. MARQUEZ (2007), así mismo la presencia de polifenoles y

capacidad antioxidante del cacao es dependiente de factores como la madurez, variedad, reacciones, procesamiento y almacenamiento.

4.3.3 Índice de actividad antioxidante (IAA).

Los resultados del Índice de Actividad Antioxidante (IAA) se presenta en el Cuadro 14 y Figura 18, al respecto podemos indicar que entre los tratamientos presentó diferencia estadística significativa (A-Va) comparando los resultados mediante la prueba de tukey ($P \leq 0,05$), encontramos que el mayor índice de actividad antioxidante correspondió al grano ($0,745 \pm 0,001$) y el menor fue para el grano tostado ($0,698 \pm 0,007$) Según SCHERER Y TEIXEIRA (2007), considera que los extractos tienen una débil actividad antioxidante cuando el IAA $< 0,5$; moderada cuando el IAA está entre 0,5 y 1,0; fuerte cuando el IAA está entre 1,0 y 2,0 y muy fuerte cuando el IAA $> 2,0$.

Cuadro 14. Resultados del IAA en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

Etapas de proceso	Tratamientos	IAA
Grano	T ₁	0,745± 0,001 ^a
Grano tostado	T ₂	0,698± 0,007 ^b
Grano molido	T ₃	0,762± 0,002 ^a
Licor de cacao	T ₄	0,737± 0,005 ^a
Polvo de cacao	T ₅	0,740± 0,007 ^a
Cocoa-vainilla	T ₆	0,702± 0,010 ^b

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

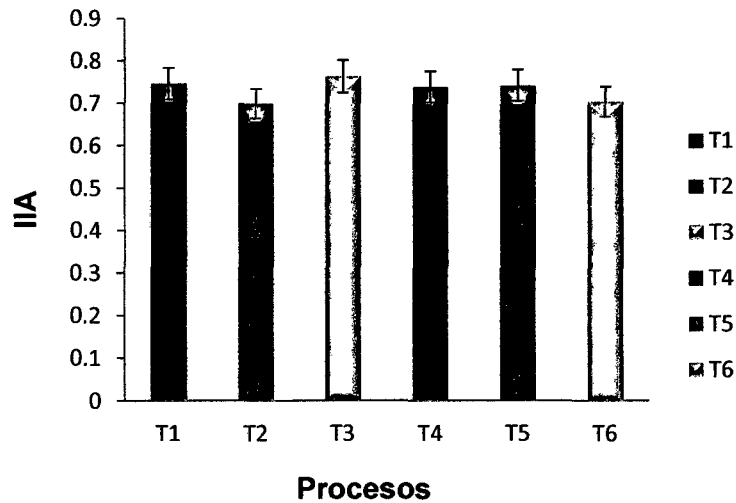


Figura 18. Comportamiento del IAA en las diferentes etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

En general como podemos apreciar y relacionar lo establecido por SCHERER y TEIXEIRA (2007), que los valores obtenidos durante las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao de IAA se relacionan con el calificativo de moderado.

4.4 Determinación de la capacidad antioxidante del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS).

4.4.1 Coeficiente de inhibición IC_{50} en los diferentes lotes de muestreo.

La evaluación de la capacidad antioxidante en las muestras de cacao se realizó por dos métodos debido a que los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios, por esta razón se

recomienda utilizar diferentes compuestos cromógenos mediante el radical ABTS, DPPH, FRAP etc. Que son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos con acción antioxidante y sirven para captar los radicales libres generados.

De los resultados sobre los lotes de muestreo presentados en el Cuadro 15 y Figura 19, podemos apreciar que entre los tratamientos se encontró diferencia estadística significativa (A-VIa), comparando los promedios mediante Tukey ($P \leq 0,05$), encontramos que el segundo lote ($41,799 \pm 0,764$ $\mu\text{g/mL}$) presentó una menor capacidad antioxidante frente al radical ABTS caso que no sucedió con el radical DPPH, esto puede deberse a que ambos radicales tienen medidas diferentes de los compuestos antioxidantes tal como lo indica OVACO y PINEDA (2011), que cita que el ABTS mide la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, la mayoría de antioxidantes naturales son multifuncionales y su actividad en diversos productos o comidas heterogéneas no pueden ser evaluados con un solo método.

VILLANUEVA *et al.*, (2010), reporta que el radical ABTS es utilizado ampliamente para medir la actividad antioxidante.

Por otro lado esta diferencia puede deberse a que en el procesamiento ingresan lotes de diferentes agricultores como se puede saber en la zona las áreas de cultivo que tiene un productor de cacao es pequeño y la planta de procesamiento para un turno utiliza aproximadamente 8 t.

Cuadro 15. Resultados del IC₅₀ del radical ABTS en los diferentes lotes de muestreo.

Lote de muestreo	IC ₅₀ (µg/mL)
1ro.	35,998 ± 0,545 ^b
2do	41,799 ± 0,764 ^a
3ero	35,799 ± 0,179 ^b

Los valores representan (promedio ± SEM) datos provienen del experimento (n=5) valores de la misma columna con superíndices diferentes son significativos (p≤0,05).

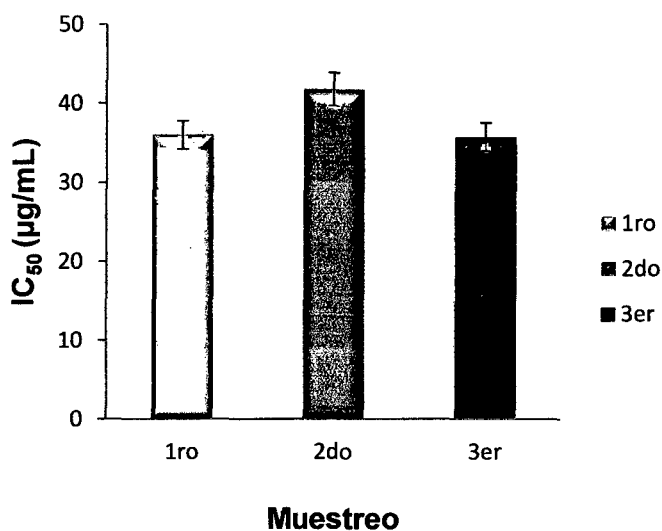


Figura 19. Comportamiento del IC₅₀ con el radical ABTS en los diferentes lotes de muestreo.

4.4.2 Coeficiente de inhibición IC₅₀ del ABTS en las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

Según los resultados presentados en el Cuadro 16 y Figura 20, referido al comportamiento del IC₅₀ del radical ABTS podemos indicar que entre las etapas de muestreo se encontró diferencia estadística significativa (A-

Vib), comparando los resultados mediante la prueba de tukey ($P \leq 0,05$), se encontró que la mayor capacidad antioxidante frente a este radical lo presento los granos de cacao antes de proceso, sin embargo las muestras de grano molido, licor de cacao y polvo de cacao son similares estadísticamente pero han perdido capacidad antioxidante.

Así mismo, la menor capacidad antioxidante se encontró en las muestras de grano tostado y cocoa con vainilla tal como sucedió en el análisis de las muestras frente al radical DPPH.

El grano de cacao tuvo IC_{50} 34,918 $\mu\text{g/mL}$ al respecto RADOJCIC *et al.*, (2009), indican que el grano de cacao ha atraído atención debido al alto contenido de polifenoles que estos a su vez tienen efectos beneficiosos para la salud humana por las propiedades antioxidantes relativamente altas.

Cuadro 16. Resultados del IC_{50} del radical ABTS en las etapas de proceso de licor de cacao y polvo de cacao.

Etapas de proceso	Tratamientos	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
Grano	T ₁	34,918± 0,054 ^b
Grano tostado	T ₂	39,183± 0,339 ^a
Grano molido	T ₃	38,279± 0,299 ^{ab}
Licor de cacao	T ₄	36,850± 1,436 ^{ab}
Polvo de cacao	T ₅	38,639± 1,315 ^{ab}
Cocoa-vainilla	T ₆	39,323± 1,439 ^a

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

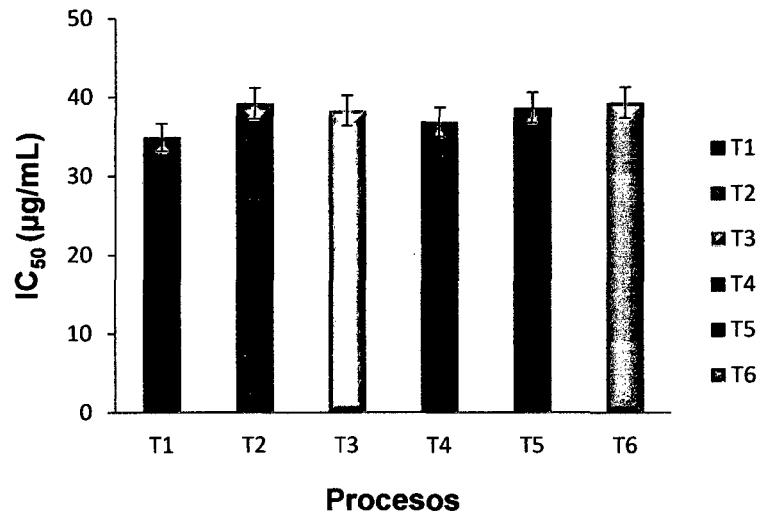


Figura 20. Comportamiento del IC₅₀ con el radical ABTS en las diferentes etapas de proceso.

Así mismo, PEREA *et al.*, (2009), reporta valores de capacidad antioxidante frente al radical ABTS y FRAP en diversas muestras de proceso (grano, tostado, molido, madurado y mezclado), pero la mayor actividad estuvo en los granos $361,45 \pm 44,68$ mmol TROLOX/kg y $369,96 \pm 54,25$ µmol Fe(II)/g respectivamente.

Los resultados de las muestras ordenadas de acuerdo a la capacidad antioxidante fue licor de cacao IC₅₀ 36,850 µg/mL, grano molido IC₅₀ 38,279 µg/mL y polvo de cacao IC₅₀ 38,639 µg/mL. Al respecto RADOJCIC *et al.*, (2009), indican que el licor de cacao es la materia principal para la producción de chocolate y es un factor crucial en determinar la característica sensorial y los valores alimenticios del chocolate, la composición de esta depende de la variedad del grano, de los procesos de poscosecha, y condiciones de tostado.

Según PEREA *et al.*, (2009), los valores de ABTS los ordena de la siguiente manera molienda $283,51 \pm 42,64$ mmol TROLOX/kg y Licor $270,11 \pm 82,40$ mmol TROLOX/kg dichos valores fueron muy cercanos entre ellos, este comportamiento fue parecido al encontrado en la investigación. Así mismo, Hill *et al.*, (2009), y TABERNERO *et al.*, (2006), reportan valores de ABTS para licor de cacao $290,29 \mu\text{mol TROLOX/g}$ y para polvo de cacao $54,74 \mu\text{mol TROLOX/g}$, según la comparación de los resultados podemos indicar que los valores encontrados en la investigación tienen el mismo comportamiento a los resultados realizados por otros investigadores.

La menor capacidad antioxidante lo presento el grano tostado IC_{50} $39,183 \pm 0,339 \mu\text{g/mL}$ y cocoa-vainilla IC_{50} $39,323 \pm 1,439 \mu\text{g/mL}$ comparando estos resultados con respecto al grano podemos indicar que en el tostado se perdió 12,2% y en la cocoa-vainilla 12,6% de capacidad antioxidante. Según PEREA *et al.*, (2009), reporta para tostado $274,40 \pm 37,41$ mmol TROLOX/kg y para cocoa con grasa vegetal $51,42 \pm 16,57$ mmol TROLOX/kg, realizando la misma comparación con respecto al grano en el tostado pierde 24% y en la cocoa 85,8 %.

Al respecto Hill *et al.*, (2009), y TABERNERO *et al.*, (2006), reportan $42,72 \mu\text{mol TROLOX/g}$ en chocolate con leche. De los reportes encontrados podemos indicar que en productos elaborados con polvo de cacao la capacidad antioxidante disminuye grandemente.

En resumen referido al comportamiento frente al radical ABTS la mejor capacidad antioxidante la presento el grano de cacao antes de ingresar al proceso y el menor correspondió al grano tostado y cocoa-vainilla.

4.5 Análisis de multivariado - componentes principales.

Para poder evaluar el comportamiento de los polifenoles totales, antocianinas, actividad antioxidante mediante los radicales de DPPH y ABTS^{•+} en las diferentes etapas de proceso como grano, grano tostado, grano molido, licor de cacao, polvo de cacao y cocoa-vainilla se realizó el análisis de componentes principales, los resultados del análisis estadístico se presentan en el A-VIIa. A-VIIb.

En la Figura 21 se presenta el biplot de variables del primer componente (CP1) separa la antocianina del resto de variables (polifenoles, DPPH, ABTS), representando el 63,1 % de la variabilidad total entre los indicadores de calidad de las seis operaciones evaluadas. Así mismo, el DPPH representa el 29,0 % de la variabilidad en el segundo componente (CP2) y ambos componentes representan el 92,1 % de la variabilidad total.

Así mismo, la menor capacidad antioxidante se encontró en las muestras de grano tostado y cocoa-vainilla tal como sucedió en el análisis de las muestras frente al radical DPPH.

Observando la Figura 21 podemos indicar que el CP1 que es la muestra de grano de cacao estuvo más asociado a las antocianinas y no sucede esto en los productos de las diferentes etapas de proceso (grano tostado, molido, licor de cacao, polvo de cacao y cocoa-vainilla). Según AGUILERA (2009), la degradación de antocianinas puede ocurrir durante la extracción/purificación y durante el procesamiento (pH, temperatura, presencia de oxígeno, degradación enzimática y las interacciones con otros componentes alimenticios).

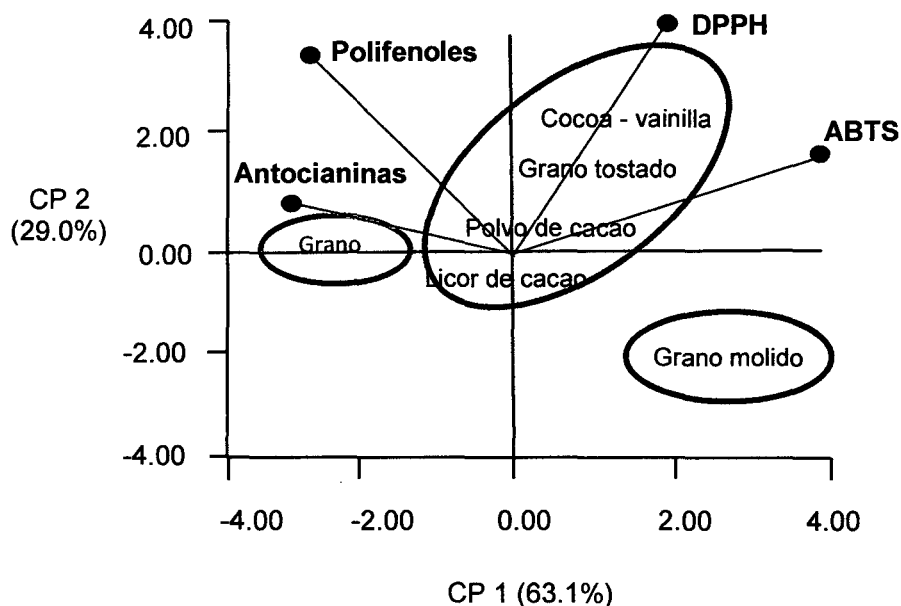


Figura 21. Comportamiento del biplot polifenoles totales, antocianinas, radicales de DPPH y ABTS^{o+} en las diferentes etapas de proceso.

Al respecto ASTRID (2008), también indica que el incremento de la temperatura provoca la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula de apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras. Así mismo CERON (2008), indica que las antocianinas son muy inestables y se degradan ante algunos factores como la temperatura ya que no deben exceder los 40 °C.

El CP2 fue representado por el DPPH cuya variabilidad fue 29,0%, esta prueba permitió medir la capacidad antioxidante de las muestras en estudio. Al respecto GUTIÉRREZ (2002), en su investigación previa de muestra que los sabrosos productos del grano del cacao son ricos en antioxidantes específicos con la estructura básica de las catequinas y epicatequinas,

polifenoles similares a los encontrados en los vegetales y el té y que le confieren a la grasa del chocolate una particular resistencia a la peroxidación. MILLER *et al.*, (2009), mencionan que el cacao y el chocolate son productos muy bien conocidos por tener flavan-3ol (flavonol) compuesto polifenolico, el cual tiene capacidad antioxidante significativa. Así mismo Hill *et al.*, (2009), reporta que el cacao y sus productos derivados como el polvo de cacao, licor de cacao y chocolates tienen diferentes contenidos polifenolicos como también diferentes niveles de capacidad antioxidante.

Según el análisis de conglomerados de la Figura 22, referente a las muestras evaluadas podemos diferenciar 3 grupos; el grupo 1 representa 66,7 % (cocoa-vanilla, grano tostado, licor de cacao y polvo de cacao) todas las muestras son productos del procesamiento del grano de cacao; el grupo 2 represento 16,65% (grano entero) y este viene a ser la materia prima para ingresar al procesamiento de cacao y el grupo 3 represento 16,65% (grano molido).

El grupo 1 se encontró más asociado al DPPH y ABTS que son pruebas para medir la capacidad antioxidante, PEREA *et al.*, (2009), refiere en cuanto a la actividad antioxidante del cacao medida por el método FRAP y ABTS, se observaron diferencias significativas para los productos derivados de cacao y se encontró que la mayor capacidad antioxidante la posee el chocolate amargo o licor de cacao puro, en tanto que el chocolate de mesa con azúcar y el chocolate con clavos y canela presentaron una capacidad antioxidante 2,5 veces menor debido a que estos productos contienen aproximadamente un 30% de licor de cacao.

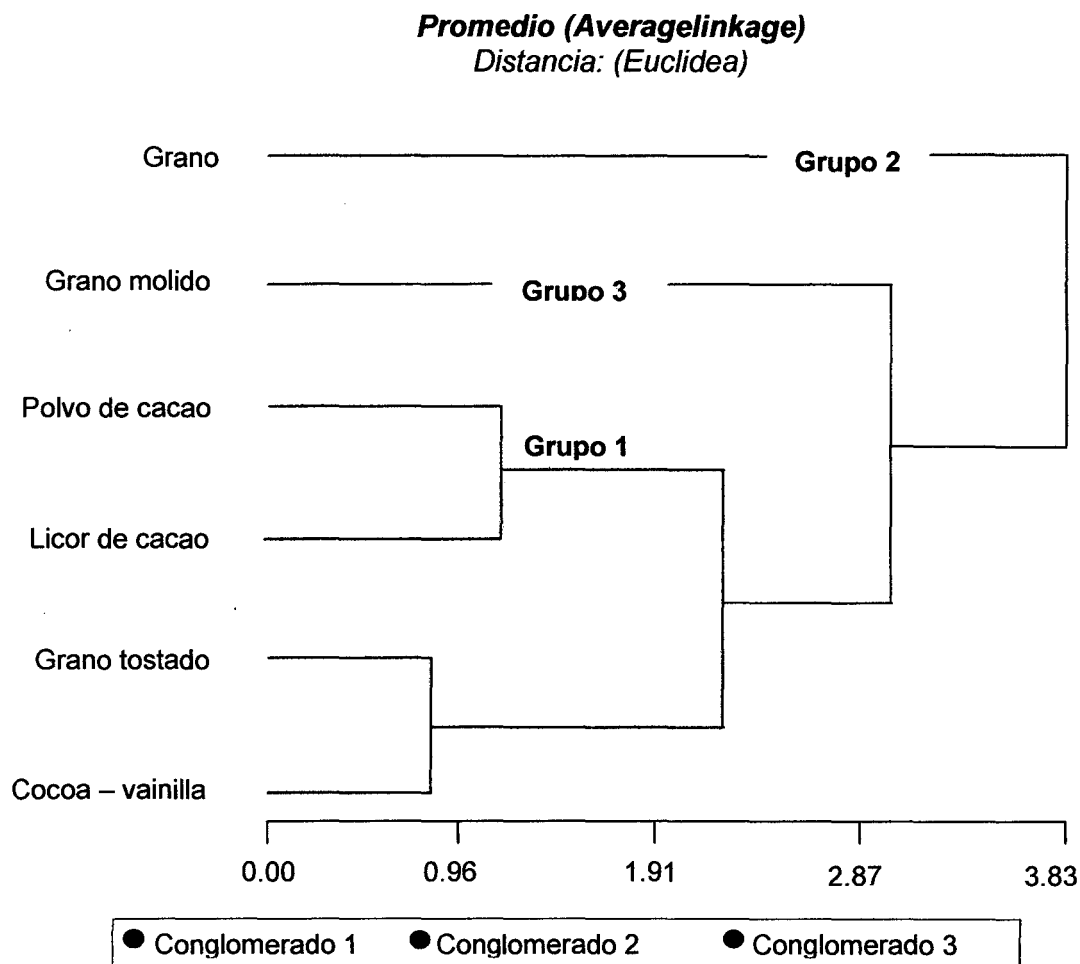


Figura 22. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras del procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

El grupo 2 estuvo conformado por la muestra de grano de cacao que estuvo más asociado a las antocianinas y polifenoles al respecto podemos indicar según MATOS *et al.*, (2010), que las antocianinas son más estables cuando no son afectados por la temperatura, calor durante el procesamiento y almacenamiento, HUANCA (2010), menciona que el efecto de los polifenoles en alimentos y su función biológica ha sido difundido especialmente en cacao porque es una fuente rica en polifenoles, Así mismo, estos polifenoles son

considerados en el cacao como los responsables para explicar el mecanismo de su efecto antioxidante.

El grupo 3 estuvo conformado por la muestra de grano de cacao molido, como podemos apreciar este grupo no estuvo asociado a ninguna de las pruebas realizadas, esto puede deberse a que la muestra de grano molido es el producto que se obtiene después del tostado y descascarillado, según MADRID (2001), esta operación se realiza a unos 60°C con la finalidad de que se funda la manteca de cacao.

V. CONCLUSIÓN

- El mayor contenido de polifenoles totales se encuentra en granos de cacao $6,394 \pm 0,095$ g EAG/100 g de muestra y el menor en granos tostados y molidos $4,036 \pm 0,105$ g EAG/100 g de muestra.
- Los contenidos de antocianinas en las etapas de procesamiento del licor y polvo de cacao estuvieron entre $1,490 \pm 0,043$ a $0,074 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g de muestra.
- La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH correspondió al grano molido $IC_{50} 51,158 \pm 0,117$ $\mu\text{g/mL}$ (IAA $0,762 \pm 0,002$) y la menor capacidad antioxidante fue para el grano tostado $IC_{50} 55,986 \pm 0,599$ $\mu\text{g/mL}$ (IAA $0,698 \pm 0,007$) y la cocoa-vainilla $IC_{50} 55,700 \pm 0,805$ $\mu\text{g/mL}$ (IAA $0,702 \pm 0,010$).
- La mayor capacidad antioxidante frente al radical ABTS correspondió al grano $IC_{50} 34,918 \pm 0,054$ $\mu\text{g/mL}$ y la menor capacidad antioxidante fue para el grano tostado $IC_{50} 39,183 \pm 0,339$ $\mu\text{g/mL}$ y la cocoa-vainilla $IC_{50} 39,323 \pm 1,439$ $\mu\text{g/mL}$.
- El contenido de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante varía en las etapas de procesamiento de licor de cacao y polvo de cacao.

VI. RECOMENDACIÓN

- Consumir licor de cacao por tener buen contenido de polifenoles totales y una buena actividad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS^{o+}
- Estudiar los polifenoles totales, antocianinas, actividad antioxidante en cascara de cacao y su efecto en la conservación de carnes.
- Evaluar la capacidad antioxidante, polifenoles totales y antocianinas en productos de chocolatería.
- Realizar estudios de la capacidad antioxidante, polifenoles totales y antocianinas durante el almacenamiento de los productos de licor de cacao, cocoa en polvo y otros productos de chocolatería.
- Cuantificar el contenido de monómeros (epicatequina, catequina), oligómeros (procianidinas) quercitina, clovamide que son sustancias con propiedades antioxidantes.

ABSTRACT

This research was developed in the laboratories of (CIPNA – CIDBAM) - UNAS. The objectives were to quantify the content of total polyphenols, anthocyanins and to determine their antioxidant capacity by their ability to inhibit free radicals 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) and 2,2 - azinobis (3etilbenzotiazoline)-6-acidosulfonic (ABTS) during the process of cocoa liquor and cocoa powder. The samples were ground and defatted by the Folch method. Hydroalcoholic extracts were prepared by weighing 10 g of cocoa in 100 mL (water / ethanol 50:50 v / v), macerating it for 24 h, filtering and centrifuging at 10000 rpm/10min/4°C. The results were analyzed using a complete randomized design (CRD) and a complete randomized block design (CRBD), and in the treatments with statistical differences a Tukey test ($p < 0.05$) was used using SAS version 9.0. To analyze all treatments in conjunction a principal component multivariate analysis was used using the statistical software InfoStat version 2011. The highest content of total polyphenols in the process of making cocoa liquor and cocoa powder was found in the grain with $6.394 \text{ g} \pm 0.095 \text{ g EAG/100 g}$ and the lowest was found in the grounded grain with $4.036 \pm 0.105 \text{ g EAG/100 g}$. The highest content of anthocyanins was in the grain with $1.490 \pm 0.043 \text{ mg cyanidin-3-glucoside/g}$ and the lowest was in the grounded grain with $0.074 \pm 0.003 \text{ mg cyanidin-3-glucoside/g}$ and the greatest inhibitory capacity for the DPPH radical was $IC_{50} = 51.158 \pm 0.117 \text{ } \mu\text{g/mL}$ and the greatest capacity to inhibit the ABTS radical was $IC_{50} = 34.918 \pm 0.054 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAZOLA D. 2003. Producción de los alimentos de los dioses (*Theobroma cacao* L.). Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. p. 5-8.
- AGUILERA O. M. 2009. Caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo (*figus carica*) variedad Misión. Tesis de Doctor en Ciencias con Acentuación en alimentos. Lerdo Durango, México. Universidad Autónoma de nuevo León de la facultad de ciencias bilógicas. 137 p.
- 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.
- AKITA, M., KUWAHARA, M., ITOH, F., NAKANO, Y., OSAKABE, N., KUROSAWA, T., TSUBONE, H. 2008. Effects of cacao liquor polyphenols on cardiovascular and autonomic nervous functions in hypercholesterolaemic rabbits. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* Tokio, Japan. 103(6):581-587.
- ANDERSON, D y PHILLIPS, B. 1999. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* Carshalton, Surrey. 37(9-10):1015-1025.
- ANDRIOLI, T. E. 2000. Free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*

Arkansas, EEUU. 180(8):650-651.

ARLORIO, M., LOCATELLI, M., TRAVAGLIA, F., COISSON, J., DEL GROSSO, E., MINASSI, A., APPENDINO, G., MARTELLI, A. 2008. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao L.*). Food Chemistry. Novara, Italy 106:967-975.

ASTRID G, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. Universidad Nacional de Colombia, departamento de química. Bogotá, Colombia. 13(3):27-36.

AVELLO, M. y SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Scielo, Concepción, Chile. 494(2) 161-172.

BADUI D. S. 1981. Química de los alimentos. 1 ed. México. Alhambra. p. 278-81.

BADUI D. S. 1988. Diccionario de tecnología de los alimentos. México. Alhambra. 298p.

BENAVIDES, N., G. A. 2012. Actividad antioxidante, polifenoles totales, antocianinas y oxidación lipídica de la pulpa de ungurahui (*oenacarpusbatauamart*). Tesis ing. Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 96p.

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

BRAUDEAU, J. 1981. El Cacao Colección Agricultura Blume. Barcelona, España. 279 p.

- BRITO, E., GARCIA, P., GALLAO, M., CORTELAZZO, A., FEVEREIRO, P., BRAGA, M. 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation, drying and roasting. *J. Sci. Food Agric.* 81: 281-288.
- CASTEL, M. V. 2010. Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto. Tesis de Magister en ciencia y tecnología de alimentos. Santa Fe, Argentina. Universidad Nacional del Litoral de la facultad de Ingeniería Química. 171 p.
- CHESMAN, E. E. 1944. Fertilization and embryogeny in (*Theobroma cacao L.*). *Ann. Of. Bot.* 41(161):107-127.
- CERON, B. M. 2008. Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de la zarzamora. Tesis profesional ingeniera química y alimentos. Puebla, México. Universidad de la Américas. 70 p.
- CIENFUEGOS, J. E., DEL MAR, Q. 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, España. 57(14):6156-6162.
- CODEX STAN 141-1983, Rev. 1-2001. Norma para el cacao en pasta y torta de cacao. [en línea]:
<http://www.ipffsaph.org/cdsupload%5Ckopopdata%5Ccodex0%5Cescxs1415.pdf>, documento, 18 Oct. 2010).

- CONDEZO, C., O. J. 2011. Polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante (DPPH y peroxilo) en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) comercial de Tingo María y Tocache. Tesis ing. Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 80p.
- CORDOVA, Z. 2003. Estadística descriptiva e inferencial. Aplicaciones. 5 ed. Lima, Perú. Ed. Librería Moashera S.R.L. 87p.
- CRESPO, E. y CRESPO, F. 1997. Cultivo y beneficio del cacao CCN-51. Ed. El Conejo. 94 p.
- CUBERO, E., ENRIQUEZ, G., HERNANDEZ, A., y RODRIGUEZ, T. 1992. Quality of cocoa in four cacao growing zones of Costa Rica. Turrialba. San Jose. vol. 42(3): 287 – 293.
- DEL VALLE L., G.; GONZALEZ L. A. y BÁEZ S. R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinífera* L.) y su relación con el color. Chapingo, México. 28(4):359-368.
- DEL CARPIO, C.; SERRANO, C. Y GIUSTI, M. 2009. Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler. Revista de la Sociedad Química del Perú. Cuzco, Perú. 75(1):76-85.
- DESROSIER, N. 1985. Elementos de tecnología de alimentos. 3 ed. México, CECSA. 783 p.
- DIPLOCK, A. T. 1991. Antioxidant nutrients and disease prevention and overview Am J. Clin. Nutr. Londres. 53 (1 Suppl):189-193.
- ESPINOZA, J., MITE, F., CEDEÑO, S., BARRIGA, S., ANDINO, J. 2006. GIS-based site-specific management of cocoa. Northern Latin American. 90: 36 -39.

- FOLIN - CIOCALTEU, SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; RAVENTOS, R. 1927
Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants
by gent. Meth Enzymol p: 152-178
- GIUSTIN, M.M. Y WROLSTAD, R. E. 2001. Characterization and Measurement
of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In: Current Protocols in
Food Analytic Chemistry. New York, EE UU. Unit. F1.2. 1-13 p.
- GONZÁLEZ, F.; ANTEPARRA, M.; ADRIAZOLA, J; NATIVIDAD, R. y GARCIA,
L. 2007. Cultivos industriales tropicales: cacao, café y palma aceitera.
UNAS-Tingo María – Perú. 92 p.
- GONZÁLEZ, T. M., BETACOURT, R. M., y ORTIZ, M. R. 2000. Daño Oxidativo
y Antioxidantes. Bioquímica. Iztapalapa, México. Universidad Autónoma
Metropolitana Unidad. 25(1): 3-9.
- GUTIÉRREZ, A. 2002. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. Acta
farm. Bonaerense. Santa Clara, Cuba. 21(2):149-152.
- HALLER, W., FORKMANN, G. 1993. Biosynthesis, in the flavonoides. Advances
in research since 1986 (Harbone JB9). Chapman and Hall Ltda. London.
499-535 p.
- HARDY, F. 1970. Manual del Cacao. Ed. Turrialba. Costa Rica. 430 p.
- HAVSTEEN, B. 1983. Flavonoids A class of natural products of high
pharmacological potency. Biochempharmacol. 32(7):1141-1148.
- HERNÁNDEZ, R.; FERNÁNDEZ C. y BAPTISTA L. 2001. Metodología de la
investigación. México. Ed. McGraw - Hill interamericana de editores S.A.
México. 503 p.
- HILL, C., LAW, C., SUZANNAH, S., MISNAWI AND CLOKE, M. 2009.

- Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). As. J. Food Ag. Ind. Bangkok, Thailandia. 2(4):702-722.
- HOPIA, I., KOHKONEN, P., VOURELA, J., RAHUA, P., PIHLAJA, K., KUJALA, S.; HEINONEN, M. 1999. Actioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. Helsinki, Finlandia. 47(10):3954-3962.
- 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 ing. Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 80p.
- ITINTEC. 1994. Normas técnicas: 208.002, 210.003. Perú. Vol. 15 (1).
- JULIAN L. A P. 2009. Propiedades físicas y químicas de tres variedades del fruto de *annona di versifolia*. Tesis de Ingeniero en alimentos. Huajuapán de León, México. Universidad Tecnológica del Mixteca. 78 p.
- JURADO. J. A., MUÑOZ. L. V. 2009. Caracterización del aceite de las semillas de *solanumquitoense* L variedad la selva y evaluación de su actividad antioxidante. Tesis de tecnólogo en Química. Pereira, Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira. 70p.
- KOWALSKA, J., SIDORCZUK, A. 2007. Analysis of the effect of technological processing on changes in antioxidant properties of cocoa processed products. J. Food Nutr. Scie. Polonia. Vol. 57, Nr. 2(A): 95 – 99.
- KUSKOSKI, E., ASUERO, A., TRONCOSO, A., MANCINI-FILHO, J., 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; COTELLE, N. 2000. Antioxidant properties of di-tert-butyl hydroxylated flavonoids. Free Rad. Biol. Med. Villeneuve d'Ascq, France.29 (9): 290-291.
- LEE, K., KIM, Y., LEE, H., LEE, CH. 2003. Cocoa has phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. J. Agric. FoodChem. Seul, Coreadel Sur. 51 (25): 7292 – 7295.
- LEYVA D. D. E. 2009. Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Tesis de ingeniero en alimentos. Huajuapán de León, México. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 80 p.
- LIMA, H. 2002. Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. Universidad de la Habana. Cuba. p. 2 - 4.
- MADRID, V. 2001. Nuevo Manual de Industrias Alimentarias. Madrid, España. Ed. Mundi Prensa. 610 p.
- MARQUEZ, L.; TORRES, F. y PRETELL, C. 2007. Antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpas de frutas. Revista Pueblo Continente. Trujillo, Perú. Vol. 18 (2): 209 – 214.
- MATOS-CHAMORRO, A., PAREDES-GUSMAN, J. y SERRANO-AROSEMENA, S. 2010, Evaluar la influencia de la nisina en la preservación de las antocianinas durante el proceso y almacenamiento del jugo de uva (*Vitisvinífera*). In: Encuentro de investigación universitaria (III, Lima, Perú). 2010. Universidad Peruana Unión. 1 p.

- MILLER, K., APGAR, J., SWEIGART, D., STUART, A., MCHALE, N., KONDO, M., HURST, W. 2009. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *Journal of Food Science*. USA. 74(6):398-404.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2000. Taxonomía y morfología del cacao (*Theobroma cacao L.*), Lima, Perú, FIMART S.A.C. 105 p.
- MONTES, S. 1981. Bromatología. 2 ed. Buenos Aires, Argentina, Universitaria. Volumen II. 609 p.
- NATSUME, M., OSAKABE, N., YAMAGISHI, M., TAKIZAWA, T., NAKAMURA, T., MIYATAKE, H., HATANO, T., AND YOSHIDA, T. 2000. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*. Japan. 64(12): 2581-2587.
- 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*. Hamburgo, Alemania. 19:612-619.
- ODRIOZOLA, S. 2009. Obtención de zumos y frutos cortados con alto potencial antioxidante mediante tratamientos no térmicos. Memoria para optar el grado de Doctor. Brasil. Universidad de L. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. 367 p.
- OLIVERAS, L. M. 2005. Calidad del aceite de oliva virgen extra. Antioxidantes y función biológica. Tesis de Doctor en Farmacia. Granada, España. Universidad de Granada. 300 p.

- OLIVIERO, T., CAPUANO, E., CAMMERER, B., FOGLIANO, V. 2009. Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model system. *J. Agric. Food Chem*, Napoli, Italia. 57(1):147-152.
- 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 p.
- OVACO, V., PINEDA, LL. 2011. Los residuos de cacao (*Theobroma cacao* L.) como fuente alternativa de antioxidantes. Tesis Ing. Industrias Agropecuarias. Loja, Ecuador. Universidad Católica de Loja. 42p.
- PALADINO, S. 2008. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*vitisvinifera* L.). Tesis de Magister en Alimentos (Mención en Ciencias). Mendoza, Argentina. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. 100 p.
- PELLIGRINI, N.; RE, R.; YANG, M. y RICE – EVANS, C. 1999. Screening of Dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts of Antioxidant Activities Applying 2,2-azinobis (3-Ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Decolorization Assay. *Methods in Enzymology*. 299:379-391.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J. & SAURA-CALIXTO, F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*. Madrid, España. 39:791-800.
- PEREA, V., CADENA, C., HERRERA, A. 2009. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*. Bucaramanga,

Colombia.41(2):120-126.

- POLYAKOV, N; LESHINA, T; KONOVALOVIA, T; KISPERT, L. 2001. Carotenoides as scavengers of free radicals in fenton reaction: Antioxidantes or prooxidants. J. free rad. Boil.And med. Novosibirsk, Rusia.31(3):398-404.
- POO B., S. 2005. Concentración de Antocianinas en Jugo de Cranberries (*Vacciniummacrocarpon*Ait.) mediante Nanofiltración.Tesis para obtener el grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia, Chile. Escuela de Ingeniería en alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 62 p.
- PORTER. L., MA. Z., CHAN, B. 1991. Cacao procyanidins: Major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*. 30(5):1657- 1663.
- QUINTERO H. C. 2004. Efecto de la copigmentación sobre el color y estabilidad del pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano. Tesis de Químico farmacobiología. Puebla, México. Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas Puebla. 70 p.
- RADOJCIC, I., DELONGA, K., MAZOR, E., DRAGOVIC-UZELAC, V., CARIC, M., VORKAPIC-FURAC, J. 2009. Polypehnlolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors.Czech j. Food Sci.Zagreb, Croacia.27 (5):330-337.
- REILLY, P. y BULKEY, G. 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites *British Journal of Surgery* Baltimore, EEUU. 77(12):1323-1324.

- RODRÍGUEZ, P.; DAMICO, N.; DE PASQUALE, R. y COSTA, G. 2001. Effects of *Vacciniummyrtillus* Anthocyanins on Triiodothyronine Transport in the Rat. *Pharmacol. Res.* 22 (Suppl. 3):59-60.
- ROZAN, P., HIDALGO, S., NEJDI, A., BISSON, F., LALONDE, R., MESSAOUDI, M. 2007. Preventive antioxidant effects of cocoa polyphenolic extract on free radical production and cognitive performances after heat exposure in wistar rats. *J of FoodScience.* Vandoeuvre-lès-Nancy, Francia. 72(3):203-206.
- SALINAS M., Y.; ROJAS H., L.; SOSA M., E. y PÉREZ H., P. 2005. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolusvulgaris*L.) cultivadas en México. *Agrociencia.* Chapingo, México. 39: 385-394.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L. y MILLER, M. 2001. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidiummeyenii*). *Publicaciónaceptada.* Food chemistry.1-23.
- SCHERER, R. y TEIXEIRA, H. 2007. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 – diphenyl - 1 – picrylhydrazyl method. *Food Chemistry.* Campinas, Brasil. 112:654-658.
- SIES, H. 1997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. *Academia Press Inc.* USA. 38:292-293.
- STAHL, L., MILLER, K., APGAR, J., SWEIGART, D., STUART, D., MCHALE, N., OU, B., KONDO, M., y HURST, W. 2009. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin

- content in foods prepared with cocoa powder. *J of Food Science*.EEUU. 74(6):456-461.
- STRACK D. y WRAY, V.1994. The anthocyanins glycosides In: the flavonoides. J BHarbone (ed). Chapman Hall, Londres. p. 1-22.
- TABERNERO, M., SERRANO, J., SAURA-CALIXTO, F. 2006. The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. *International Journal of FoodScience and Technology*. España. 41:28-32.
- TOMÁS 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, España. 55(10):3926-3935.
- TOVAR DE DIOS, J. 2001. Estudio del efecto de la aplicación de diferentes estrategias de riego al olivo (*Olea europea* L.) de la variedad arbequina sobre la composición del aceite. Tesis de Doctora. Lleida, España. Universidad de Lleida. 177 p.
- UGARTONDO, C. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. *J. Agric. Food Chem*.Barcelona, España. 54:6945-6950.
- VILLANUEVA-TIBURCIO, J.; CONDEZO HOYOS, L. y ASQUIERI, E. 2010. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu – camu (*Myrciariadubia* (H.B.K) Mc

Vaugh). *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas, Brasil.* 30(Supl.1):151-160.

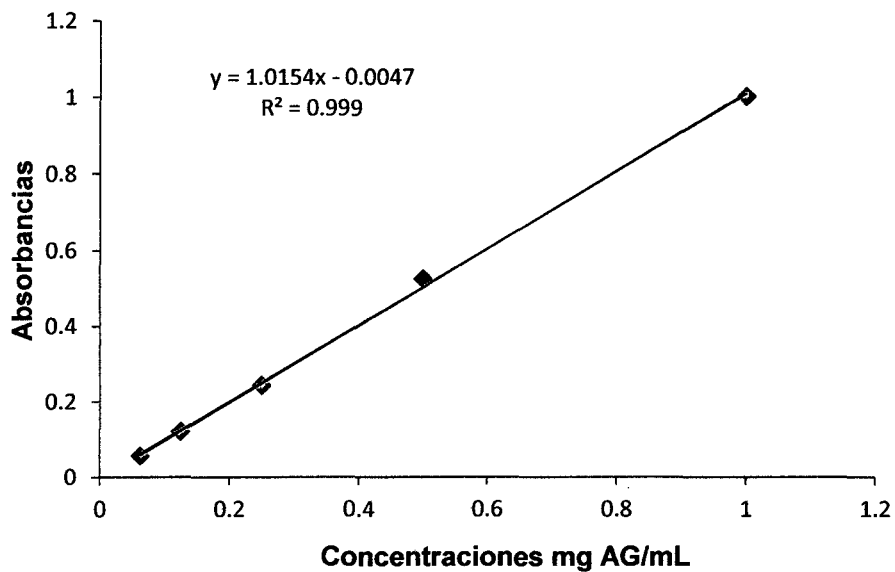
WINKEL B., SHIRLEY. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plan Physiol. Virginia, EEUU.* 126(2):485-493.

WOOD, G. A. R. 1982. *Cacao.* Ed. Continental. S.A. México. 363p.

VIII. ANEXO

A-la. Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g).

Concentraciones (mg AG/mL)	Absorbancias (700nm)					Promedio
	r1	r2	r3	r4	r5	
1,000	0,909	0,895	1,110	1,076	1,021	1,002
0,500	0,547	0,537	0,522	0,510	0,544	0,532
0,250	0,255	0,236	0,229	0,245	0,245	0,242
0,125	0,123	0,120	0,118	0,113	0,128	0,120
0,063	0,057	0,052	0,064	0,047	0,054	0,055



A-lb. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

A-IIa. Análisis de varianza cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra), según los lotes de muestreo.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Muestreo	2	10,06198896	5,03099448	17,13	**
Procesos PL/PC	5	45,67093516	9,13418703	31,10	**
Error experimental	82	24,08688184	0,29374246	-----	-----
Total	89	79,81980596	-----	-----	-----
R2 = 0,698 CV = 10,192 MSE = 0,542 Media = 5,317					

A-IIb. Análisis de varianza cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra), durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Procesos PL/PC	5	45,67093516	9,13418703	22,47	**
Error experimental	84	34,14887080	0,40653418	-----	-----
Total	89	79,81980596	-----	-----	-----
R2 = 0,572 CV = 11,990 MSE = 0,638 Media = 5,318					

A-IIIa. Análisis de varianza cuantificación de antocianina (mg cianidina-3-glucósido/g muestra), según los lotes de muestreo.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Muestreo	2	0,13084222	0,06542111	12,71	**
Procesos PL/PC	5	22,35028966	4,47005793	868,68	**
Error experimental	82	0,42195684	0,00514582	-----	-----
Total	89	22,90308872	-----	-----	-----
R2 = 0,982		CV = 18,630	MSE = 0,072	Media = 0,385	

A-IIIb. Análisis de varianza cuantificación de antocianina (mg cianidina-3-glucósido/g muestra), durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Procesos PL/PC	5	22,35028966	4,47005793	679,24	**
Error experimental	84	0,55279907	0,00658094	-----	-----
Total	89	22,90308872	-----	-----	-----
R2 = 0,976		CV = 21,068	MSE = 0,081	Media = 0,385	

A-IVa. Análisis de varianza del IC₅₀ del radical DPPH, según los lotes de muestreo.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Muestreo	2	15,2682253	7,6341126	2,21	**
Procesos PL/PC	5	281,9716878	56,3943376	16,30	**
Error experimental	82	283,6309398	3,4589139	-----	-----
Total	89	580,8708529	-----	-----	-----
R2 = 0,512		CV = 3,478	MSE = 1,859	Media = 53,472	

A-IVb. Análisis de varianza del IC₅₀ del radical DPPH, durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Procesos PL/PC	5	281,9716878	56,3943376	15,85	**
Error experimental	84	298,8991651	3,5583234	-----	-----
Total	89	580,8708529	-----	-----	-----
R2 = 0,485		CV = 3,528	MSE = 1,886	Media = 53,472	

A-Va. Análisis de varianza IAA, durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Procesos PL/PC	5	0,04869756	0,00973951	15,37	**
Error experimental	84	0,05322427	0,00063362	-----	-----
Total	89	0,10192182	-----	-----	-----
R2 = 0,4778 CV = 3,444 MSE = 0,025 Media = 0,731					

A-VIa. Análisis de varianza del IC₅₀ del radical ABTS, según los lotes de muestreo.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Muestreo	2	696,783067	348,391534	49,37	**
Procesos PL/PC	5	215,284938	43,056988	6,10	**
Error experimental	82	578,633235	7,056503	-----	-----
Total	89	1490,701240	-----	-----	-----
R2 = 0,612 CV = 7,015 MSE = 2,656 Media = 37,865					

A-VIb. Análisis de varianza del IC₅₀ del radical ABTS, durante las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	Sig.
Procesos PL/PC	5	215,284938	43,056988	2,84	**
Error experimental	84	1275,416302	15,183527	-----	-----
Total	89	1490,701240	-----	-----	-----

R² = 0,144 CV = 10,291 MSE = 3,897 Media = 37,865

A-VIIa. Coeficiente de correlación en las etapas del procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

Correlación de Pearson: Coeficientes/Probabilidades				
	Polifenoles	Antocianinas	DPPH	ABTS
Polifenoles	--	--	--	--
Antocianinas	0,0992	--	--	--
DPPH	0,8429	0,6030	--	--
ABTS	0,2443	0,0627	0,2354	--

A-VIIb. Análisis de componentes principales en las etapas de procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao.

Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Prop. Acumulada
1	2,52	0,63	0,63
2	1,16	0,29	0,92
3	0,18	0,05	0,97
4	0,13	0,03	1,00

Autovectores		
Variables	e ¹	e ²
Polifenoles	-0,48	0,54
Antocianinas	-0,58	0,15
DPPH	0,29	0,80
ABTS	0,59	0,20

Correlaciones con las variables originales		
Variables	CP 1	CP 2
Polifenoles	-0,76	0,58
Antocianinas	-0,93	0,17
DPPH	0,46	0,86
ABTS	0,93	0,21

A-VIIIa. Control de calidad de la evaluación física (prueba de corte en 100 granos de cacao secos).

Evaluación física	Limite Porcentual
Granos pizarrosos	3%
Granos violetas	15%
Granos parcialmente violetas	7%

Fuente: Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, 2012.

En el cuadro del anexo A-VIIIa, se muestra el control de calidad que se realizó para verificar el grado de fermentación del grano, siendo un 75% de grado de fermentación aceptable, por lo que podemos decir que es posible que el contenido de antocianinas está relacionado con la calidad del grano, ya que los granos secos usados para el análisis de antocianinas nos dio como resultado promedio $1,490 \pm 0,043$ mg cianidina-3-glucósido/g de muestra, dato que podemos comparar con lo que establece CUBERO *et al.*, (1992), reportó sobre el proceso de fermentación en granos sin fermentar 12 mg cianidina-3-glucósido/g y 1,72 mg cianidina-3-glucósido/g en almendras fermentadas, con ello finalmente podemos acotar que es posible que el análisis de antocianinas también pueda ser un parámetro de control de calidad en el manejo del grado de fermentación aceptable.