

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA  
DE ALIMENTOS**



**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES  
TOTALES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS PREPARADOS CON  
LICOR Y POLVO DE CACAO.**

**Tesis**

**Para optar el título de:**

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**CASIQUE ROJAS, CARLOS**

**PROMOCIÓN 2012 - II**

**Tingo María - Perú**

**2014**



**T**  
**IND**  
**Casique Rojas, Carlos**

Determinación del contenido de Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante en alimentos preparados con Licor y Polvo de Cacao. Tingo María 2014.

93 páginas.; 12 cuadros; 13 figuras.; 90 ref.; 30 cm.

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

**1-POLIFENOLES 2- ANTOCIANINAS 3- CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**  
**4-ALIMENTOS PREPARADOS CON CACAO 5- LICOR DE CACAO**  
**6- POLVO 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



*"Año de la promoción de la industria responsable y del compromiso climático"*

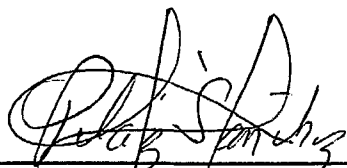
### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado que suscriben, reunidos en acto público el 29 de Abril del 2014, a horas 12:00 pm a 1:30 pm 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. **CASIQUE ROJAS, Carlos**, titulada:

**"DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ALIMENTOS PREPARADOS CON LICOR Y POLVO DE CACAO".**

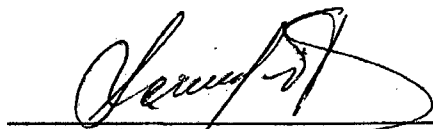
Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **BUENO**; en consecuencia el bachiller, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del consejo Universitario, de conformidad con el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

Tingo María, 29 de Abril del 2014



---

Dr. Pedro Peláez Sánchez  
Presidente



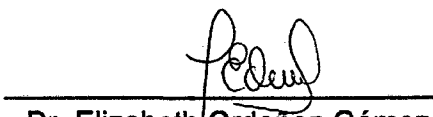
---

Ing. Sergio Rodríguez Rubio  
Miembro



---

Ing. Jaime Basilio Atencio  
Miembro



---

Dr. Elizabeth Ordoñez Gómez  
Asesor

## DEDICATORIA

A **Dios**, verdadera fuente de amor y sabiduría, por ser mí guía en cada momento de mi existencia.

A mis padres **Telesforo** y **Rosa**, Con todo mi cariño y mi amor por hacer todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi hermana **Jannina**, **cuñado** y **sobrino**, por todo su apoyo, por ser el incondicional abrazo que me motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva y en especial a la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas y a todos los docentes de la carrera.
- A la Dra. Elizabeth Susana Ordoñez Gómez por su apoyo incondicional en la culminación de mi tesis.
- A los Ing. Aurelia León Arévalo y Evil Vargas Piñan por su ayuda durante el desarrollo de la investigación.
- A mi compañera Jaira Astrid por todo su apoyo, sus constantes ánimos y perseverancia durante el desarrollo de esta experiencia.
- A mis amigos Cristian Ríos, Pierina Hurtado, Litman Arista, Angelica Soyer, Veronica Cortez, Omar Camasca y a todas aquellas personas que directa o indirectamente hicieron posible la culminación del presente trabajo.
- A los tesisistas con los que compartí la experiencia, por el apoyo mutuo brindado.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Paginas
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Generalidades del cacao .....	3
2.1.1 Origen y distribución geográfica del cacao .....	3
2.1.2 Descripción taxonómica del cacao .....	3
2.1.3 Composición química del cacao .....	4
2.1.4 Polifenoles presentes en el granos de cacao .....	5
2.1.5 Principales usos del cacao y sus derivados .....	6
2.2 Generalidades del chocolate.....	7
2.2.1 Chocolate como alimento .....	7
2.2.2 Normatividad y estándares internacionales .....	9
2.2.3 Efectos antioxidantes en chocolates .....	10
2.3 Generalidades del licor y polvo de cacao.....	12
2.3.1 Definición de licor de cacao .....	12
2.3.2 Definición de polvo de cacao.....	13
2.4 Generalidades de los alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	16

2.4.1	Definición y obtención de chocolate para taza .....	16
2.4.2	Definición de cobertura de chocolate .....	16
2.4.3	Productos de pastelería horneados .....	17
2.4.4	Bebidas a base de chocolate.....	20
2.5	Generalidades de los polifenoles .....	22
2.5.1	Definición.....	22
2.5.2	Estructura y clasificación .....	22
2.6	Generalidades de las antocianinas .....	23
2.6.1	Definición.....	23
2.6.2	Estabilidad de las antocianinas .....	24
2.6.3	Estructura química.....	25
2.7	Generalidades de los antioxidantes .....	26
2.7.1	Definición.....	26
2.7.2	Tipos de antioxidantes.....	27
2.7.3	Radicales libres .....	27
2.7.4	Métodos de evaluación.....	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
3.1.	Lugar de ejecución.....	30
3.2.	Materia prima.....	30
3.3.	Materiales, equipos de laboratorio y/o proceso y reactivos.....	31

3.3.1. Materiales de laboratorio y/o proceso.....	31
3.3.2. Equipos de laboratorio y/o proceso: .....	31
3.3.3. Reactivos y solventes.....	32
3.4. Métodos de análisis. ....	32
3.5. Metodología experimental.....	33
3.5.1. Preparación de las muestras.....	33
3.5.2. Preparación de los extractos hidroalcoholico y acuosos. ....	35
3.5.3 Cuantificación de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de caco. ....	36
3.5.4 Cuantificación de antocianinas para las muestra de alimentos preparados con licor y polvo de cacao. ....	38
3.5.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos preparados con polvo y licor de cacao. ....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	46
4.1 Cuantificación de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao. ....	46
4.1.1 Determinación de la curva patrón.....	46
4.1.2 Cuantificación de polifenoles totales.....	47
4.2 Cuantificación de antocianinas en alimentos preparados con licor y polvo de cacao. ....	54



4.3 Determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos preparados con polvo y licor de cacao. ....	58
4.3.1 Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....	58
4.3.2 Capacidad de inhibir el radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6-ácido sulfónico) (ABTS °+). ....	66
4.4 Análisis multivariado – componentes principales.....	72
V. CONCLUSIONES .....	77
VI. RECOMENDACIONES .....	78
VII. ABSTRAC .....	79
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	81
IX. ANEXO .....	93

## INDICE DE CUADROS

CUADRO		pagina
1	Composición química del cacao criollo.....	5
2	Usos del cacao y sus derivados.....	7
3	Especificaciones técnicas para el licor de cacao.....	13
4	Análisis promedio de componentes del polvo de cacao natural y alcalinizada (base seca).....	15
5	Valores de las cantidades máximas permisibles en la fabricación de galletas.....	20
6	Partes sustituibles de las antocianinas.....	25
7	Preparación de las diluciones de trabajo para el radical DPPH en las muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	43
8	Preparación de las diluciones de trabajo para el radical ABTS <sup>o+</sup> en las muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	45
9	Contenido de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	49
10	Cuantificación de antocianinas en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	56

11	Resultados del IC50 del radical DPPH en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	61
12	Resultados del IC50 del radical ABTS°+ en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS		pagina
1	Estructura química de los polifenoles.....	23
2	Estructura general de la antocianina.....	26
3	Esquema experimental para la cuantificación de polifenoles.	38
4	Esquema experimental para la cuantificación de antocianinas .....	40
5	Diseño experimental para la prueba de radical DPPH en muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	42
6	Diseño experimental para la prueba de radical ABTS <sup>°+</sup> en muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	44
7	Contenido de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	50
8	Comportamiento de la cuantificación de antocianinas en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	57
9	Comportamiento del IC50 del radical DPPH en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	62
10	Correlacion entre el contenido de polifenoles totales y la	

	actividad antioxidante (DPPH).....	66
11	Comportamiento del IC50 del radical ABTS°+ en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	69
12	Comportamiento del biplot de polifenoles totales, antocianinas, radical DPPH Y ABTS°+ en los diferentes alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	73
13	Presentacion de análisis de conglomerados para alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	74

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>		<b>Página</b>
A-I	Concentraciones de ácido gálico para la curva estándar.... ..	92
A-II	Curva patrón de ácido gálico.....	92
A-III	Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (gEAG/100g de muestra).....	93
A-IV	Análisis de varianza cuantificación de antocianinas.....	93
A-V	Análisis de varianza cuantificación de IC <sub>50</sub> (µg/ml) del radical DPPH.....	93
A-VI	Análisis de varianza cuantificación de IC <sub>50</sub> (µg/ml) del radical ABTS°+ .....	93
A-VII	Análisis de componentes principales en los alimentos preparados con licor y polvo de cacao.....	94

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del CIPNA – CIDBAM y laboratorio de carnes – UNAS. Los objetivos fueron: Cuantificar polifenoles totales, antocianinas y determinar la capacidad antioxidante mediante la capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) y ácido 2,2-azinobis(3etilbenzotiazoline)-6-acidosulfónico (ABTS) en pastel, galleta y bebidas, preparadas con licor y polvo de cacao. Las muestras solidas fueron molidas y desgrasadas por el método Folch, se preparó extractos hidroalcohólicos pesando 2g de muestra en 20mL (agua/etanol 50:50 v/v), macerado por 24h, filtrado y centrifugado a 10000 rpm/10min/4°C, para las muestras liquidas se trabajó en su propio estado como extracto acuoso. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) en los tratamientos con diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando el programa SAS versión 9.0. Para analizar los tratamientos de manera conjunta se utilizó el análisis multivariado con componentes principales, utilizando el programa estadístico Info Stat versión 2011. El mayor contenido de polifenoles totales se encontró en licor de cacao  $6,996 \pm 0,015$  mgEAG/100g y el menor galleta de chocolate  $0,339 \pm 0,008$  mgEAG/100g, en antocianinas el mayor lo presentó el licor de cacao  $0,147$  mg cy-3-glu/g muestra y el menor pastel de chocolate  $0,009$  mg cy-3-glu/g muestra. La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH lo

presento licor de cacao y el menor el pastel de chocolate con  $IC_{50}$  117,94 y 1,985 mg/mL respectivamente. Del mismo modo la capacidad antioxidante frente al radical  $ABTS^{\circ+}$  con  $IC_{50}$  19,28mg/mL para el licor y  $IC_{50}$  403,53mg/mL para pastel de chocolate.



## I. INTRODUCCIÓN

En la amazonia peruana el cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos que tiene buena producción especialmente en el valle del alto Huallaga, en la actualidad este cultivo agrícola es uno de los más importantes por su alto valor comercial a nivel mundial, destacándose además por su gran importancia como materia prima para la obtención de diversos productos de la industria de alimentos tales como confitería, bebidas, etc.

De los granos de cacao y productos de chocolatería se sabe que tienen altos niveles de compuestos polifenólicos, que tienen actividad antioxidante significativa, asociándose, así con beneficios para la salud a corto y largo plazo. Además se sabe que en nuestro país el rubro de la confitería es ampliamente comercializado teniendo así en el mercado alimentos preparados a base de chocolate como pueden ser pasteles, galletas, bebidas, que también suelen ser preparados en casa a partir del uso de recetas caseras.

Estos alimentos elaborados tienen como ingrediente principal productos derivados del cacao, como licor y polvo, que son mezclados con otros ingredientes y a su vez sometidos a distintos procesos como homogenizados, horneados, etc. Motivo por el cual nace el interés de investigar si en dichos alimentos preparados a partir de licor y polvo de cacao se conserva la capacidad antioxidante, para la cual se determinaron los siguientes objetivos:

- Cuantificar polifenoles totales en pastel, galleta y bebidas preparadas con licor y polvo de cacao.
- Evaluar el contenido de antocianinas en pastel, galletas y bebidas preparadas con licor y polvo de cacao.
- Evaluar la capacidad antioxidante mediante los radicales DPPH y ABTS en pastel, galleta y bebidas preparadas con licor y polvo de cacao.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades del cacao

#### 2.1.1 Origen y distribución geográfica del cacao

Se cree que el árbol de cacao es originario de Amazonia, 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**).

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 (**WOOD, 1982**).

#### 2.1.2 Descripción taxonómica del cacao

Clasificación taxonómica.

Nombre científico	: <i>Theobroma cacao</i> L
Nombre común	: cacao
Origen	: América latina
Reino	: Vegetal
Orden	: Malvales
Clase	: Dicotiledoneas

Familia	: Esterculiaceae
Tribu	: Birtheriaceae
Género	: Theobroma
División	: Spermatophyta
Sub división	: Angiosperma.

(ADRIAZOLA, 2003).

### 2.1.3 Composición química del cacao

El cacao es un fruto altamente energético y nutritivo, debido a que contiene una variedad de nutrientes entre los cuales están las grasas que son asimilables por el organismo, los carbohidratos, las proteínas, los minerales y las vitaminas. En el cuadro 01, se encuentran algunos de estos nutrientes. El contenido de nutrientes del cacao y de sus subproductos, cambia a medida que se somete a alguno de los procesos de producción.

- Grasa: El contenido de grasa en el cacao no es la misma para todas las variedades, a la grasa se le conoce como manteca de cacao, algunas variedades aportan el 55% de manteca de cacao, mientras que otras dan un 38% únicamente.
- Carbohidratos: Presentes en el cacao están en forma de almidones, fibra y azúcares como la sacarosa.
- Proteínas: El contenido de proteínas del cacao depende del origen, además son consideradas de baja digestibilidad y no son de alto valor biológico ya que no contienen los aminoácidos esenciales.

**Cuadro 1.** Composición química del grano de cacao Criollo

Composición química del cacao 100g	
Agua	5,8
Proteínas	12,4
Grasa	43,7
Carbohidratos	30
Fibra	4,3
Cenizas	3,8

Fuente: **HERNÁNDEZ (2010)**.

- **Minerales:** El cacao es una fuente importante de cobre y magnesio, además contiene calcio, fósforo, hierro.
- **Vitaminas:** Están presentes en el cacao son: vitamina A, tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantoténico, ácido fólico, vitamina E; cada una de las vitaminas se encuentra en indiferentes cantidades (**HERNÁNDEZ, 2010**).

#### **2.1.4 Polifenoles presentes en el granos de cacao**

El grano de cacao también es rico en elementos fotoquímicos como lo son los polifenoles y la teobromina. La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, el cual les permite actuar como agentes reductores, donadores de hidrogeno y secuestradores de oxígeno, además de tener potencial para quelar metales (**HOPIA et al. 1999**).

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten las características de poseer en sus estructuras varios anillos

bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. La oxidación de los productos de los compuestos fenólicos, al parecer son involucrados en defensa de las plantas contra la invasión de patógenos, incluyendo bacterias, fungi y virus, así como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de estas (**HERNÁNDEZ Y PRIETO, 1999**).

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 (**UGARTONDO, 2009**).

### **2.1.5 Principales usos del cacao y sus derivados**

A partir de las semillas del cacao se obtiene el cacao en grano, los cuatros productos intermedios son licor de cacao, manteca de cacao, pasta de cacao y cacao en polvo además el chocolate. A pesar de que el mercado de chocolate es el mayor consumidor de cacao en términos de equivalente en grano, productos intermedios tales como el cacao en polvo y la manteca de cacao son utilizados en diversas áreas. En el cuadro 2 se presentan algunos productos y sus usos (**LIENDO, 2005**).

**Cuadro 2.** Usos del cacao y sus derivados

<b>Subproductos</b>	<b>Usos</b>
Manteca de cacao	Elaboración de chocolate y confitería, y también puede ser usado en la industria cosmética y la industria farmacéutica.
Pulpa de cacao	Producción de bebidas alcohólicas y no alcohólicas.
Cascara	Puede ser utilizado como comida para animales.
Cenizas de cascara de cacao	Puede ser usado para la elaboración de jabón y como fertilizante de cacao, vegetales y otros cultivos.
Jugo de cacao	Elaboración de jaleas y mermeladas.
Polvo de cacao	Puede ser usado como ingrediente en casi cualquier alimento: bebidas chocolatadas, postres de chocolate como helados y mousse, salsas, tortas y galletas.
Pasta o licor de cacao	Se utiliza para elaborar chocolates

**Fuente:** LIENDO (2005)

## **2.2 Generalidades del chocolate**

### **2.2.1 Chocolate como alimento**

El chocolate como un alimento, ya que es así como se consume, es nutricionalmente completo ya que contiene aproximadamente un 30 % de materia grasa, un 6 % de proteínas, un 61% de carbohidratos, y un 3 % de humedad y de minerales (fósforo, calcio, hierro), además de aportar vitaminas A y del complejo

B. La materia grasa del chocolate es la manteca del cacao, la que contiene un 35% de ácido oleico, un 35% de ácido esteárico, un 25% de ácido palmítico, y el 5% restante está formado por diversos ácidos grasos de cadena corta cuya composición es típica de las diferentes almendras de cacao (**VINSON et al. 1999**).

La estructuración de los triacilglicéridos que componen la materia grasa del chocolate, se caracteriza por tener un punto de fusión en el rango de 27–32°C, y es esta la característica organoléptica más interesante del chocolate, ya que una barra de este producto se funde con relativa rapidez en el paladar humano, formando sin originar grumos, una masa cremosa de textura y sabor muy agradable. Los chocolates de bajo costo, confeccionados con manteca de cacao sintética, o manteca industrial, no tienen esa característica, ya que la mayoría no funden a la temperatura corporal, de ahí el sabor desagradable y grasoso que producen en el paladar. Se ha discutido sobre los efectos en el perfil lipídico de los ácidos grasos más comunes en la manteca de cacao. De hecho, se sabe que el ácido oleico tiene efectos hipcolesterolémicos, que el ácido esteárico tiene un efecto neutro, y que el ácido palmítico aumenta los niveles de colesterol plasmático. ¿Qué ocurre entonces con el consumo de chocolate cuya grasa contiene mayoritariamente estos tres ácidos grasos? Numerosos estudios han demostrado que el consumo de chocolate tiene un efecto neutro en los niveles de colesterol plasmático lo cual derivaría de un efecto de compensación de la acción de los tres ácidos grasos (**YU et al. 1995**).

El chocolate es, ciertamente, un alimento altamente energético, por lo cual constituye un excelente suplemento nutricional para atletas, o para personas con altos requerimientos de actividad física que necesitan reservas energéticas



adicionales, 100g de chocolate aportan 500 calorías, más que el pan, la carne o la leche entera (**KRIS-ETHERTON *et al.* 1993**).

### **2.2.2 Normatividad y estándares internacionales**

Como se sabe los estándares son útiles para tener un mismo concepto de algún elemento ya sea de características que deba cumplir el producto, medidas, procesos de elaboración, que en su conjunto asegure calidad en el producto, el cual se va a comercializar. En las normas oficiales del CODEX (Alimentarius Commission) por la La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS), desarrolló normas y directrices de alimentos, para proteger la salud de los consumidores y asegurar las prácticas en el comercio de alimentos, además de promover la coordinación de todo el trabajo de normas de alimentos emprendido por organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales. Esta norma está dirigida al chocolate y los productos del chocolate, los cuales tienen el fin del consumo humano, el chocolate y los productos del chocolate requieren ser preparados a partir del cacao o sus derivados, como lo es la manteca de cacao. En esta norma se menciona el proceso adecuado de fabricación, iniciando con las materias primas del cacao, tomando en cuenta que estas se pueden combinar con productos lácteos, azúcares y/o edulcorantes, entre otros aditivos.

En la elaboración de distintos productos de chocolate se pueden incluir productos alimenticios comestibles excluyendo la harina y el almidón, además de grasas animales distintas de la materia grasa de la leche. Estas adicciones están limitadas en un 40% del peso total del producto.

La norma CODEX indica que cuando se añaden grasas vegetales distintas de la manteca de cacao, no deberán exceder el 5% de producto terminado, con el fin de no reducir el contenido mínimo de la manteca de cacao. La norma menciona las proporciones de extracto seco total del cacao, para cada tipo de chocolate, como lo son; el chocolate amargo, el chocolate semidulce, el chocolate oscuro, el chocolate fondant, el chocolate dulce, la cobertura, el chocolate blanco, entre otros. También menciona la información que deber contener en el etiquetado, concluyendo en este apartado, con el relleno del chocolate, revestimiento y la determinación del contenido de grasas vegetales distintas a la manteca de cacao (**CODEX Alimentarius, 2010**).

### **2.2.3 Efectos antioxidantes en chocolates**

El consumo de cacao, inicialmente y del chocolate, posteriormente, siempre se asoció con beneficios para la salud, tales como el aportar mayor fortaleza, vigor sexual, resistencia al trabajo duro y a las bajas temperaturas, y muchos otros beneficios aunque, inicialmente, sin un fundamento científico probado. Sin embargo, el conocimiento actual de los beneficios de salud aportados por muchas sustancias de origen natural, y los adelantos técnicos que permiten la detección, la cuantificación y el análisis de las propiedades químicas y biológicas de estas sustancias, ha posicionado a muchos alimentos y productos naturales en el rango de beneficiosos para la salud. El chocolate es justamente uno de ellos, y el beneficio de su consumo se asocia directamente con el poder antioxidante de sus componentes (**WOLLGAST Y ANKLAM, 2000**).

Una gran diversidad de alimentos de origen vegetal, tanto en su estado natural como procesados, constituye una fuente variable, pero importante, de antioxidantes naturales. Las frutas y las verduras son la principal fuente dietaria de antioxidantes. Sin embargo, hay dos factores que influyen en forma muy importante en el bajo consumo de antioxidantes por parte de la gran mayoría de la población. Uno, es el bajo consumo general de frutas y verduras, y el otro, el deterioro que sufren los antioxidantes naturales cuando son consumidos a partir de alimentos procesados (calentamiento, hervor, fritura, procedimientos para conservación, entre otros). Por lo cual, existe una recomendación de consumo adicional de antioxidantes naturales, los que idealmente deberían ser aportados por alimentos de consumo habitual (**VALENZUELA et al. 2003**).

Entre los antioxidantes de origen natural que consumimos en nuestra dieta, los flavonoides ocupan un lugar muy importante. Junto con antioxidantes naturales tales como los tocoferoles, los tocotrienoles, y los carotenoides, los flavonoides son polifenoles de amplia distribución en el reino vegetal, aunque son pocos los alimentos que contienen cantidades apreciables de estos compuestos. El cacao es justamente uno de los alimentos que se caracteriza por contener una alta proporción de flavonoides. El término flavonoides es un nombre genérico para identificar colectivamente a una gran variedad de compuestos de estructura similar. Los flavonoides que se encuentran en alta concentración en el cacao, y por consiguiente en el chocolate, son los llamados flavanoles (**OSAKABE et al., 1998**).

Los flavanoles del cacao se presentan en dos formas estructurales, como entidades únicas o monómeros, o como estructuras oligoméricas

(polímeros). Dentro de los flavanoles monómeros más importantes que se encuentran en el cacao y en sus subproductos, están la (-)-epicatequina y la (+)-catequina, y entre los productos poliméricos, las procianidinas. Estas últimas moléculas se presentan con diferente grado de polimerización en el cacao y sus subproductos, se les encuentra como dímeros (2 unidades), trímeros (3 unidades), tetrameros (4 unidades), hasta decámeros (10 unidades) (**HAMMERSTONE et al. 1999**).

## **2.3 Generalidades del licor y polvo de cacao**

### **2.3.1 Definición de licor de cacao**

El cacao en pasta o licor de cacao es el producto obtenido del cacao sin cáscara ni germen que se obtiene de vainas de cacao de calidad comerciable, que ha sido limpiado y liberado de la cáscara del modo técnicamente más completo posible, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos constituyentes (**CODEX STAN 141, 2001**).

#### **2.3.1.1 Tecnología en la elaboración de licor de cacao**

La elaboración de licor de cacao es el primer paso para el desarrollo de los derivados de chocolatería siendo el primer producto que se obtiene del proceso, para su elaboración pasa por los siguientes procesos:

Limpieza, es la primera etapa en el procesamiento la cual consiste en eliminar cuerpo extraños y granos defectuosos realizado mediante corrientes de aire **DESROISER (1985)**, para luego pasar al tostado y/o torrefacción donde a través de aire sobrecalentado de 120 a 150° C por 20 a 40 minutos los granos son

tostados con la finalidad de separar la cascarilla del grano así como también reducir su humedad **BRAUDEAU (1981)**. Para terminar de separar los granos de la cascarilla pasa a un proceso de descascarillado donde se elimina este material fibroso que hace difícil la molienda y con la finalidad de obtener un chocolate y cocoa de calidad **MONTES (1985)**. En la molienda los nibs de cacao son molidos a una temperatura y finura que fluctúan dependiendo de las exigencias para el producto final y se realiza mediante rodillos **LIENDO (2005)**. La pasta obtenida de la molienda en algunos casos puede ser alcalinizada. Una vez obtenida la pasta se realiza el temperado con la finalidad de que la manteca cristalice directamente en forma estable a la hora de solidificar **DESROSIER (1985)**. En el cuadro 3, se muestran las especificaciones técnicas para el licor de cacao.

**Cuadro 3.** Especificaciones técnicas para el licor de cacao

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Humedad	2% máximo
Ph	5 – 6
Grasa	53% mínimo
Fineza (tamiz 200 mesh)	99% mínimo
Ceniza	5 – 6%
Contenido de cáscara	1,75% máximo

**Fuente:** ITINTEC (1981).

### **2.3.2 Definición de 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 105, 2001**).

Su contenido en grasa de polvo de cacao al 8% y podrá contener hasta un 6% de cascarilla y germen sobre producto seco y desgrasado y tendrá como máximo un 9% de humedad (**CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, 2001**).

### **2.3.2.1 Tecnología de la elaboración de polvo de cacao**

Para la elaboración de polvo de cacao el licor de cacao es sometido a un proceso llamado prensado esta operación se realiza para poder conseguir un producto pulverulento de la pasta de cacao, esta de ser parcialmente desengrasada, que es lo que ocurre cuando se extrae la manteca de cacao. El prensado se realiza a una presión de 400 – 500 atm y a una temperatura de 100 – 120°C (**MADRID, 2001**). Después del prensado se expulsa automáticamente la torta prensada, que normalmente contiene un 10 – 12% de grasa residual (**BECKETT, 1994**), una vez que la torta deja de la prensa esta es sometida aun troceado donde se rompe en fragmentos de menos de 3 cm de diámetro mediante dos rodillos dentados que giran en sentido contrario (**BECKETT, 2002**) estos trozos son enfriados en cilos o en depósitos portátiles que se almacenan en salas refrigeradas (**BECKETT, 1994**). Las tortas extraídas del prensado son sometidas a un pulverizado con la finalidad de reducir el cacao en polvo muy fino utilizando los molinos de bolas o de martillos. El polvo es tamizado a través de cada celda o sometido a un proceso de flotación por aire y luego empaquetados (**MONTES 1985**). El polvo de cacao también puede ser alcalinizado o natural, en el cuadro 4, se muestra los componentes.

**Cuadro 4.** Análisis promedio de componentes del polvo de cocoa natural y alcalinizada (base seca)

Componentes	Natural (%)	Alcalinizada (%)
Cenizas	6,30	10,30
Teobromina	2,90	2,80
Cafeína	0,50	0,50
Polihidroxifenoles	14,60	14,00
Proteínas	28,10	27,00
Azúcar	2,40	2,30
Celulosa	522,0	21,20
Pentosanas	3,70	3,40
Ácidos	3,70	3,40
Otras sustancias	1,20	1,10

Fuente: DESROISIER (1985).

### 2.3.2.2 Normas técnicas para el polvo de cacao

El polvo de cacao rebajado en grasa son productos obtenidos por transformación mecánica en polvo de la torta del prensado de cacao (**CODEX ALIMENTARIUS, 2010**).

El contenido de grasa del polvo de cacao rebajado en grasa debe contener menos de 20% m/m, pero no menos de 8 % m/m, calculado referido al extracto seco. Con una humedad de 7% m/m como máximo (**CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO 2001**).

## **2.4 Generalidades de los alimentos preparados con licor y polvo de cacao**

### **2.4.1 Definición y obtención de chocolate para taza**

Chocolate para mesa es el chocolate no refinado donde el tamaño del grano de azúcar es mayor a 70 micras (**CODEX STAN 87-1981**). El chocolate se hace de la semilla de cacao que se fermenta convenientemente en el lugar de origen. Las semillas se tuestan, descascarillan y se le quita el germen para dejar el grano de cacao limpio. En estas condiciones se muelen los granos hasta conseguir una pasta que se denomina masa o licor de cacao. Esta masa se mezcla con azúcar y manteca de cacao y se somete a un proceso de refinamiento. Después se añade un condimento apropiado (generalmente vainilla), y el producto ya está dispuesto para su uso. La manteca de cacao se obtiene por extracción de la grasa de la manteca; de manera que toda la masa permanezca expuesta al aire. Esta operación produce una notable mejora en el sabor (**SYDNEY, 1975**).

### **2.4.2 Definición de cobertura de chocolate**

El chocolate o cobertura de chocolate es uno de los principales productos derivados del cacao, este se obtiene mediante la mezcla homogénea de cantidades variables de pasta de cacao, o cacao en polvo o descascarillado, manteca de cacao y azúcar en polvo. Al chocolate se le puede añadir leche en polvo, con lo que obtendríamos el chocolate con leche, y el producto obtenido de mezclar manteca de cacao, leche en polvo y azúcar, es lo que conocemos como chocolate o cobertura blanca. Los chocolates se pueden consumir tal cual, en sus diversas variedades, se puede acompañar con pan, frutas o frutos secos. Forma parte de multitud de elaboraciones de pastelería y repostería, y es prácticamente



imprescindible para una especialidad pastelera como es la bombonería. **(MARTÍNEZ, 2010).**

#### **2.4.2.1 Uso de la cobertura**

Es un elemento de importancia en la pastelería industrial, da buen sabor a los productos y mejora el acabado que deja en los productos terminados influye mucho en el valor comercial de los mismos. La cobertura es una composición de cocoa, azúcar y un porcentaje elevado de manteca de cacao para conseguir una fluidez suficiente debe ser bien aromatizado y poco dulce. Hay tres clases de coberturas: la marrón oscuro, la de leche y la blanca, también se puede conseguir cobertura de color, pero esta no compagina muy bien con el sabor de chocolate, actualmente existen maquinas bañadores que dan un acabado perfecto y una elevada producción de géneros **(GIANOLA, 1973).**

#### **2.4.3 Productos de pastelería horneados**

El término pastelería es el que se utiliza para denominar al tipo de gastronomía que se basa en la preparación, cocción y decoración de platos y piezas dulces o saladas tales como postre, tortas, pasteles, galletas, budines y muchos más. Dentro de ella encontramos un sinfín de áreas específicas de acuerdo al tipo de preparación que se haga, como por ejemplo la bombonería. Los productos de pastelería son los productos alimenticios elaborados básicamente con masa de harina, fermentada o no, rellena o no, cuyos ingredientes principales son harinas, aceites o grasas, sal o azúcar, agua, con o sin levadura, a la que se pueden añadir otros alimentos, complementos panarios o aditivos autorizados y

que han sido sometidos a un tratamiento térmico adecuado (**ZUCCARELLI et al. 1984**).

#### **2.4.3.1 Pastel de chocolate**

El pastel de chocolate o torta de chocolate, es un postre conocido internacionalmente, que se popularizó a finales del siglo XIX y se sirve frecuentemente en reuniones, como fiestas de cumpleaños y bodas. Los ingredientes pueden variar dependiendo de la receta, pero por lo general incluyen una combinación de huevos, azúcar, polvo de cacao, chocolate, mantequilla o aceite, agua o leche, sal y bicarbonato de sodio. Otras variaciones pueden incluir chocolate derretido, crema ácida, suero de mantequilla, jugo de frutas o jarabes.

Los panaderos usan extracto de vainilla, licores o líquidos condimentados como el café, para añadir diferentes gustos al sabor del chocolate. Se usan además una variedad de decorados, escarchados o glaseados, así como especias. El pastel de chocolate es la base para otras variedades de torta, como el pastel Selva Negra y el pastel alemán, el cual se prepara con coco, nueces, crema acaramelada y la torta de chocolate (**MARIANI, 1999**).

#### **2.4.3.2 Galletas**

Las galletas son productos de consistencia más o menos dura y crocante, de forma variable, obtenidas por el cocimiento de masa preparada con harina, con o sin leudantes, leches, féculas, sal, huevos, agua potable, azúcar, mantequilla, grasas comestibles, saborizantes, colorantes, conservadores y otros ingredientes permitidos debidamente autorizados (**INDECOPI, 1992**).

Estos productos son muy bien aceptados por la población, tanto Infantil como adulta, siendo, consumidos preferente entre las comidas, pero muchas veces también reemplazando la comida habitual de media tarde. Sus ingredientes son principalmente harina, azúcar y materias grasas, además de leche y huevos en algunos casos. Esta composición química declarada hace suponer que estos productos constituiría una buena fuente calórica para el hombre y en especial para el niño (ZUCCARELLI *et al.* 1984).

Las galletas se clasifican en:

**Por su sabor:** Saladas, dulces y de sabores especiales.

**Por su presentación:** Simples, cuando el producto se presenta sin ningún agregado posterior luego del cocido; rellenas, cuando entre dos galletas se coloca un relleno apropiado; revestidas, cuando exteriormente presentan un revestimiento o baño apropiado y pueden ser simples y rellenas.

**Por su forma de comercialización:** Galletas envasadas, son las que se comercializan en paquetes sellados de pequeña cantidad; galletas a granel, son las que se comercializan generalmente en cajas de cartón, hojalata o tecnopor. Se especifica los siguientes requisitos a considerarse en la fabricación de galletas: Deberán fabricarse a partir de materias sanas y limpias, exentas de impurezas de toda especie y en perfecto estado de conservación, será permitido el uso de colorantes naturales y artificiales, conforme a la norma técnica 22:01-003 Aditivos Alimentarios, y cumplir con los requisitos fisicoquímicos cuyos valores se muestran en el cuadro siguiente con las cantidades máximas permisibles (INDECOPI, 1992).

**Cuadro 5.** Valores de las cantidades máximas permisibles en la fabricación de galletas.

<b>Características fisicoquímicas</b>	<b>Cantidades</b>
Humedad	12%
Cenizas totales	3%
Índice de peróxido	5mg/Kg
Acidez (expresado en ácido láctico)	0.10%

**Fuente: INDECOPI 1992**

#### **2.4.4 Bebidas a base de chocolate**

##### **2.4.4.1 Definición de bebida**

La palabra bebida es una palabra de uso común que se refiere a todos los líquidos (naturales o artificiales) que pueden ser utilizados para el consumo humano. Desde el agua potable hasta los productos líquidos más exóticos pueden ser considerados bebidas siempre y cuando su consumo este permitido para el hombre. Cuando se habla de bebidas se hace referencia principalmente a aquellos productos que suponen cierta elaboración como lo pueden ser las bebidas gaseosas, los jugos, las infusiones o las bebidas alcohólicas. Sin embargo, como el agua potable también es consumida como bebida, la misma puede fácilmente entrar dentro de esta categoría (FAO, 1992).

##### **2.4.4.2 Clasificación de bebidas**

Las bebidas se clasifican en dos grandes grupos: alcohólicas y no alcohólicas. En el grupo de bebidas no alcohólicas se encuentran las carbonatada

y no carbonatadas. Entre las bebidas no carbonatadas se incluyen los jugos de frutas, bebidas de frutas, néctares de frutas, te, chocolate y café (FAO, 1992).

- **Bebidas nutracéuticas:** utilizan un término nutracéutico para referirse a compuestos fotoquímicos, que se encuentran naturalmente en pequeñas cantidades en algunos alimentos y cuya ingesta disminuye el riesgo de contraer ciertas enfermedades (SHAHIDI Y WEERASINGHE, 2004).

- **Bebidas no carbonatadas sin alcohol:** es una bebida no alcohólica que no contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto, elaborada a partir de agua potable, adicionado con azúcar y otros edulcorantes permitidos, sabores naturales o artificiales, con o sin la adición de sustancias perseverantes, vitaminas y otros aditivos alimentarios permitidos y que has sido sometidos a un proceso tecnológico adecuado (SHAHIDI Y WEERASINGHE, 2004).

#### 2.4.4.3 Bebida a base de cacao

El cacao se toma menos como bebida, a diferencia con el resto de los productos como son té, café, etc. sino en forma sólida. Además de los alcaloides estimulantes, en especial la teobromina, los preparados de cacao contienen cantidades considerables de nutrientes (grasas, glúcidos y proteínas), también al contrario de lo que ocurre con el café y el té, hace falta consumir grandes cantidades de ellos para lograr una acción estimulante. Es de importancia el contenido de teobromina, a la que debe el cacao su acción estimulante, muy inferior, como hemos dicho, a la del café, además de teobromina posee cafeína, aunque en escasa proporción (alrededor del 0,2 %). Así, una taza normal de bebida de cacao contiene 0,1 g. de teobromina y 0,01 de cafeína; la teobromina se

halla en los granos de cacao ligada muy débilmente al tanino, se libera por acción del ácido acético formado durante la fermentación de los granos **(RODRIGUEZ, 2001)**.

## **2.5 Generalidades de los polifenoles**

### **2.5.1 Definición**

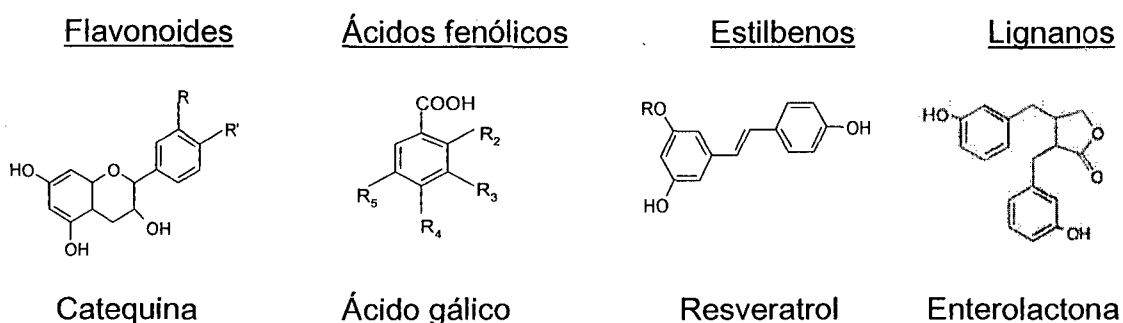
Los compuestos polifenólicos, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados como metabolitos secundarios. Se caracterizan por la presencia de más de un grupo de fenol por molécula. Estas moléculas son importantes para la fisiología de las plantas porque contribuyen a la resistencia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

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 *at al.* 1999)**.

### **2.5.2 Estructura y clasificación**

Desde el punto de vista químico, los polifenoles se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (grupo fenol); la estructura de los polifenoles varía de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, a estructuras complejas, como los taninos condensados. Se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos

estructurales unidos a esos anillos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. En la siguiente figura se presenta la estructura química de algunos polifenoles **UGARTONDO (2009)**.



**Figura 1.** Estructura química de los polifenoles.

## 2.6 Generalidades de las antocianinas

### 2.6.1 Definición

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos que se hallan en las células epidermales o subepidermales de la planta, principalmente en flores y frutos. Para la industria, tienen un potencial considerable en la rama alimentaria como aditivo, por su carácter inocuo (**VARGAS et al. 2002**).

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

Las antocianinas tienen un carácter antioxidante, por lo que su

consumo puede suponer un beneficio para la salud, ya que disminuyen los niveles de colesterol, proveen protección contra las enfermedades cardíacas y previenen ciertos tipos de cáncer, el color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio **(POO, 2005)**.

### **2.6.2 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 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 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)**.



### 2.6.3 Estructura química

Las antocianinas son de color rojo y violeta, solubles en agua, y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, formadas por una molécula de antocianidina (aglucon) que se une a una fracción de carbohidrato a través de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química de los antocianidinas consiste en un grupo flavilo que a la vez está formado por una molécula de benzopirano unida a un anillo fenílico; los monosacáridos comúnmente encontrados son: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa; entre todas las antocianidinas que se conocen actualmente, las más importantes son la pelargonidina, la cianidina, la delphinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina, (BADUI, 1981 y QUINTERO, 2004), tal como se presenta en el siguiente Cuadro.

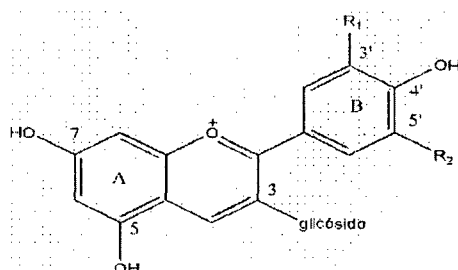
**Cuadro 6.** Partes sustituibles de las antocianinas.

Aglicona	Sustitución		$\lambda$ max (nm)
	r1	r2	espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delphinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

Fuente: QUINTERO, 2004.

Las antocianinas son glucósidos solubles en agua de antocianidinas y son parte de los compuestos fenólicos conocidos como flavonoides con un anillo-A

benzoil y un anillo-B hidroxicinanoil. La estructura de la antocianina es el 2-fenilbenzopirilio de la sal de flavilio (**QUINTERO, 2004**).



**Figura 2.** Estructura general de la antocianina

## 2.7 Generalidades de los antioxidantes

### 2.7.1 Definición

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

Los antioxidantes "neutralizan", o bloquean la recepción en las moléculas del radical libre del oxígeno, que puede causar daño a la estructura y a la función de las membranas celulares, el DNA de las proteínas de la célula pueden ser dañados (**RAMOS, 2007**).

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

### 2.7.2 Tipos de antioxidantes

Los tipos de antioxidantes son los siguientes:

#### **Antioxidantes enzimáticos**

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos a las ERO, como es el caso de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) entre otras.

#### **Antioxidantes no enzimáticos**

Algunos de los antioxidantes no enzimáticos son: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como selenio, cinc, o vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), éstos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes (HICKS *et al.* 2006).

### 2.7.3 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado, 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.

Generalmente los radicales libres se forman por transferencia de electrones secundaria a reacciones metabólicas, las tres vías de formación son: 1) por la ruptura hemolítica del enlace covalente; 2) por la pérdida de un electrón; y 3) por la adición de un electrón. Las condiciones externas que promueven la producción de radicales libres son: la contaminación, altas temperaturas, radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, rayos X, medicamentos, el humo del tabaco y el smog (**GONZÁLES *et al.* 2000** y **RODRÍGUEZ *et al.* 2001**).

#### **2.7.4 Métodos de evaluación**

##### **2.7.4.1 Radical 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)**

Es un radical libre estable y se utiliza como indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto que posea actividad antioxidativa. El principio del método de DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (ejemplo compuesto fenólico) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina y una especie radical. En este proceso, la reacción desarrolla un cambio de color de violeta a amarillo o naranja pálido, a medida que disminuye la absorbancia detectable a 515 nm (**LEBEAU *et al.* 2000**).

##### **2.7.4.2 Radical 2,2-azobis (3-etilbenzotiazolino-6- ácido sulfónico) (ABTS<sup>o+</sup>)**

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  $\lambda$  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  $\lambda$  (414, 645, 734, 815 nm), pero se mide a una longitud de onda  $\lambda$  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 ( $\lambda$  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**).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (CIPNA) y el Centro de Investigación y 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, departamento 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.

- **Chocolate para taza, T1 (ChT)**, sol de tingo maría presentación en tableta de 90g, pasta de chocolate con 75 % de pasta de cacao obtenida de la cooperativa agraria industrial NARANJILLO Ltda.
- **Licor de cacao, T2 (LC)**, pasta fina de cacao obtenido de agroindustrias MAKAO PERÚ S.A.C, presentación en tableta de 90g elaborado con 100% pasta de cacao.

- **Polvo de cacao, T3 (PC)**, la muestra tomada fue cocoa BAHIA obtenida de la cooperativa agraria industrial NARANJILLO Ltda. en presentación de sobre de 90g.
- **Cobertura de cacao, T4 (CC)**, obtenido de agroindustrias MAKAO PERÚ S.A.C, presentación en tableta de 90g.con 45% pasta de cacao y 30% de manteca de cacao.

### **3.3. Materiales, equipos de laboratorio y/o proceso y reactivos**

#### **3.3.1. Materiales de laboratorio y/o proceso.**

Matraces de Erlenmeyer de 250 mL; vasos de precipitación de 250 y 1000 mL; pipetas graduadas de 5 y 10 mL; tubos de ensayo 10 mL; fiolas de 10, 25 y 50; probetas graduadas de 10, 100 y 250 mL; frascos ámbar de 100 mL; embudo; micropipetas 0-10  $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L; cubetas de poliestireno (1cmx 1cmx4.5cm); tips, (1000 y 200  $\mu$ L); microtubos (1,5 -2,00 mL); papel de filtro; pinzas; espátulas; gradillas y bolsas trilaminadas de 1 kg.

#### **3.3.2. Equipos de laboratorio y/o proceso.**

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 IcebeamDoorCooling LG modelo GR-5392QLC (Corea); Desionizador modelo D 7035 (Barnstead); Agitador magnético modelo 625 standard (VWR™ hotplate/stirrer); Homogenizador

modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industrias. SITM); Centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich); pH - metro (Mettler Toledo Seven Easy) pH 0-14, T° 0-100°C SN 8513902; Empacadora Multivac modelo A 300/16.

### 3.3.3. Reactivos y solventes.

Ácido clorhídrico (HCl) (Merk) pureza 36,5 %; cloruro de potasio (KCl) pureza 99,5 %; acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) pureza 99 %; ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) al 98,1% Sigma ; folin–ciocalteu phenolre agent, 2N, Sigma Aldrich; carbonato de Sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); metanol y etanol al 99% de pureza; 1,1-Diphenyl-1-picril-hydrayl (DPPH; Sigma Aldrich, USA); 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline – 6 ácido sulfónico) diammoniumsolt(ABTS; agua destilada desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>); persulfato de Potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) p.a. Sigma Chemical.

### 3.4. Métodos de análisis.

**Cuantificación de polifenoles totales:** Se realizó por el método espectrofotométrico de Folin y Ciocalteu reportado por (WOLLGAST y ANKLAM, 2000).

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

#### **Determinación de la capacidad antioxidante**

- **Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH),** se utilizó el método espectrofotométrico de luz visible a 517 nm descrito por (BRAND-WILLIAMS *et al.* 1995).



- Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS<sup>o+</sup>), se realizó por el método descrito por (PELLIGRINI *et al.* 1999).

### 3.5. Metodología experimental.

#### 3.5.1. Preparación de las muestras.

##### 3.5.1.1 Pastel de chocolate (PCH)

Insumos para la masa: Se utilizó 500 g de harina cernida, 125 g de mantequilla, 250 g de azúcar; 4 unid de huevos, 250 g de polvo de cacao, 250 ml de leche, 1 g de sal, 2 g de polvos de hornear; 3 ml de esencia de vainilla.

Insumos para el relleno: Se utilizó 90 g de cobertura chocolate, 20 g de mantequilla, 5 ml de agua.

#### Preparación

Para la masa: En un recipiente grande se batió la mantequilla con el azúcar y se agregó los huevos enteros, luego se añadió la harina cernida con la sal y el polvo de hornear alternándolo con la leche, se removió toda la mezcla y finalmente se agregó el polvo de cacao con la esencia de vainilla. Luego se enmantequillo y enharino un molde redondo de N° 8, se colocó la mezcla y se llevó al horno pre calentado, el horneado se realizó 165 °C/45 minutos, se retiró del horno, se enfrió y se desmoldo.

Para el relleno: Se preparó un baño maría en ella se cocolo un recipiente sobre el cual se dejó la cobertura de chocolate en pedazos para que pueda disolverse con el calor, se adicionó también el agua y mantequilla y se removió hasta que todos los ingredientes estén homogéneos y fundidos.

Decoración del pastel: el pastel horneado y enfriado se parte por la mitad horizontal con el uso de un cuchillo tipo serrucho, en una de las capas colocar todo el relleno preparado y con la otra mitad tapar el relleno. Para la parte exterior bañar con fodge de chocolate 80g con una espátula distribuir todo el fodge sobre la torta para conseguir una buena presentación.

### **3.5.1.2 Galleta de chocolate (GCH)**

**Insumos:** 500 g de harina, 1 g de polvo de hornear, 0.5 g de sal, 170 gr de mantequilla blanda, 250 g de azúcar, 1 unid de huevo, 3 ml de esencia de vainilla, 250 g de polvo de cacao y 90 g de cobertura de cacao.

**Preparación:** En un recipiente se cernió la harina, polvos de hornear y la sal, en otro recipiente se colocó la mantequilla y se batió hasta que este cremosa, luego se agregó el azúcar, vainilla y la harina y se continuó batiendo y finalmente se agregó el polvo de cacao, se siguió amasando hasta que esta no se pegue en las manos y tenga buena plasticidad, se bolea para dejar en reposo por 15 minutos cubierto con una bolsa de plástico para evitar que se seque la masa y se coloca en refrigeración. Seguidamente tomar 7g de masa y moldear en forma de cuadrado y rombo, se colocó en una lata previamente enmantequillada y enharinada, se llevó al horneado a 165 °C/15 minutos, se retiró, se enfrió y se desmoldo.

### **3.5.1.3 Bebida de licor de cacao (BLC)**

Para la preparación de la bebida de chocolate se tomó 3 g de licor de cacao, 100 ml de agua, 12 g de azúcar, 0,5 g de clavo de olor y 0,5 g de canela,

se puso a calentar el agua hasta el punto de ebullición y se adicionó todos los ingredientes y se dejó hervir por 5 minutos (LEE *et al.* 2003).

#### **3.5.1.4 Bebida de polvo de cacao (BPC)**

Para la preparación de la bebida de polvo de cacao se colocó 3 g de cocoa en una taza con 100 ml de agua hervida, se adicionó 12 g de azúcar y se procedió a remover hasta homogenizar la mezcla (LEE *et al.* 2003).

#### **3.5.1.5 Bebida de chocolate para taza y polvo de cacao (BChP)**

Para la preparación de la bebida se colocó 2 g de chocolate para taza, 1 g de cocoa, 12 g de azúcar, 0,5 g de clavo de olor y 0,5 g de canela, todos los ingredientes se colocó en un recipiente con 100 ml de agua, se puso a hervir por 10 minutos (LEE *et al.* 2003).

### **3.5.2. Preparación de los extractos hidroalcoholico y acuosos.**

#### **3.5.2.1 Extracto hidroalcoholico.**

Este extracto se preparó para la cuantificación de polifenoles totales y determinación de la actividad antioxidante de las muestras sólidas ChT, LC, PC, CC, PCh y GCh, el procedimiento se describe a continuación:

**Molido:** Con la finalidad de reducir el tamaño las muestras fueron sometidas a un molido de cuchillas.

**Desgrasado:** El desengrasado se realizó por solvente en frío (Método Folch), que consistió en pesar 30 g de muestra molido y macerado por 24 h en 50 mL de

solvente (1:2 v/v. metanol: cloroformo), luego se filtró para separar la torta de la grasa; la torta se secó en estufa a 45°C/15 min para evaporar el solvente.

**Envasado:** Las muestras desengrasadas fueron envasadas en bolsas de polietileno, selladas y forradas con papel aluminio.

**Almacenado:** Las bolsas con el contenido de las muestras desengrasadas se almacenaron en refrigeración previa rotulación.

**Extracto:** Se pesó 2 g de muestra desengrasada y se enrazó hasta 20 mL de solución hidroalcohólico (50:50 v/v), teniendo una concentración de 100 mg/ml, el cual se transfirió a un frasco de vidrio de color ámbar rotulado, fue sellado herméticamente y dejó en maceración por 24 horas a temperatura ambiente, seguidamente cumplido el tiempo se filtró y almacenó en congelación a -20°C hasta su análisis (**BELSCAK et al. 2009**).

#### **3.5.2.2 Extracto acuoso.**

Para las muestras de bebidas BLC, BPC y BChP fueron tratados directamente como extracto acuoso, en este caso cada bebida fue preparada antes de realizar el análisis (**LEE et al. 2003**).

### **3.5.3 Cuantificación de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.**

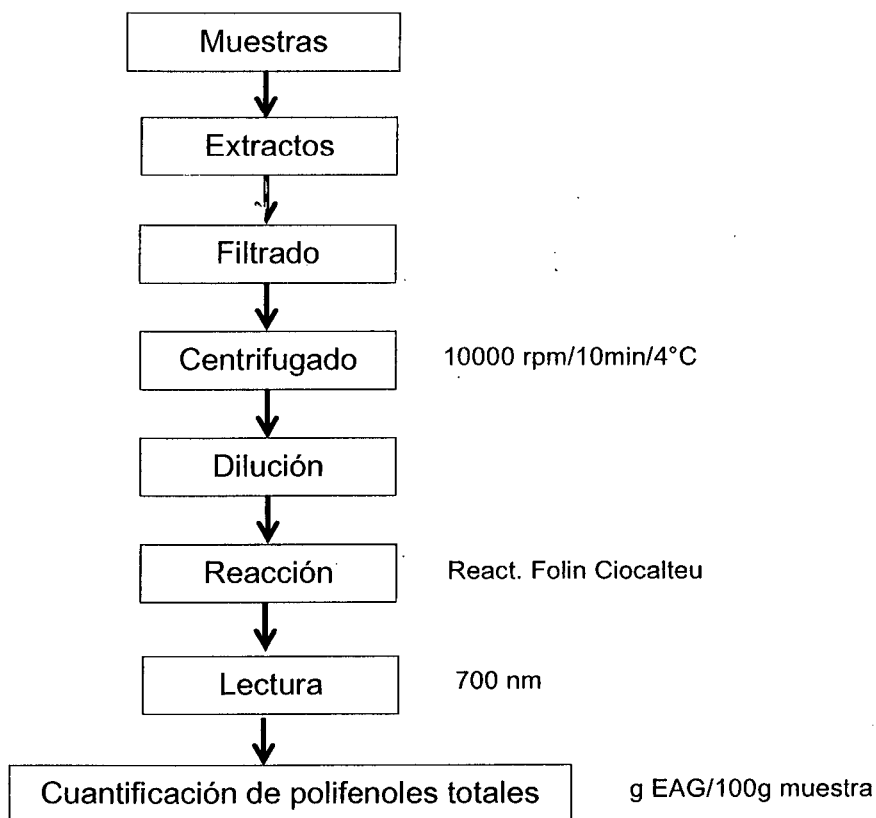
#### **3.5.3.1 Determinación de la curva estándar**

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: 1,00; 0,5; 0,25; 0,125 y 0,0625 mg/mL, cada dilución se preparó por triplicado. Se agregó a cada tubo 1,58 mL de agua desionizada y

20  $\mu\text{L}$  de la solución stock y para el caso del blanco 20  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, se homogenizo ligeramente. Luego se agregó 100  $\mu\text{L}$  de solución de fenol Folin-Ciocalteu a cada tubo, se incubo por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizo la reacción agregando 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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 graficó concentración vs absorbancia, se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

### 3.5.3.2 Cuantificación de polifenoles totales

La cuantificación de polifenoles totales de las muestras se presenta en la figura 3, se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (filtrado y centrifugado 10000rpm/10min a 4°C), a partir de ello se tomaron las muestras realizando 3 repeticiones por tratamiento previa dilución a 10mg/ml para las muestras ChT, LC, PC, CC; 50 mg/ml para las muestras PCh y GCh .Para las muestras de extracto acuoso BL, BP y BChP la concentración fue 30 mg/ml. La reacción se realizó adicionando en los tubos 1580  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 20  $\mu\text{L}$  de la muestrapreparada, 100  $\mu\text{L}$  de fenol Folin-Ciocalteu  $\mu\text{L}$  y finalmente 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, luego se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700 nm. Las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en equivalente de ácido gálico (mg EAG/100g muestra).



**Figura 3.** Esquema experimental para la cuantificación de polifenoles

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) utilizando el programa estadístico del SAS versión 9.2.

### 3.5.4 Cuantificación de antocianinas para las muestra de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

#### 3.5.4.1 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 CH<sub>3</sub>COONa, 120 mL de 1M HCl y 180 mL de agua desionizada y aforarlo a 1 litro. Se aplicó la siguiente ecuación:

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

Dónde:

**C:** Es la concentración de la antocianina expresada en mg/mL.

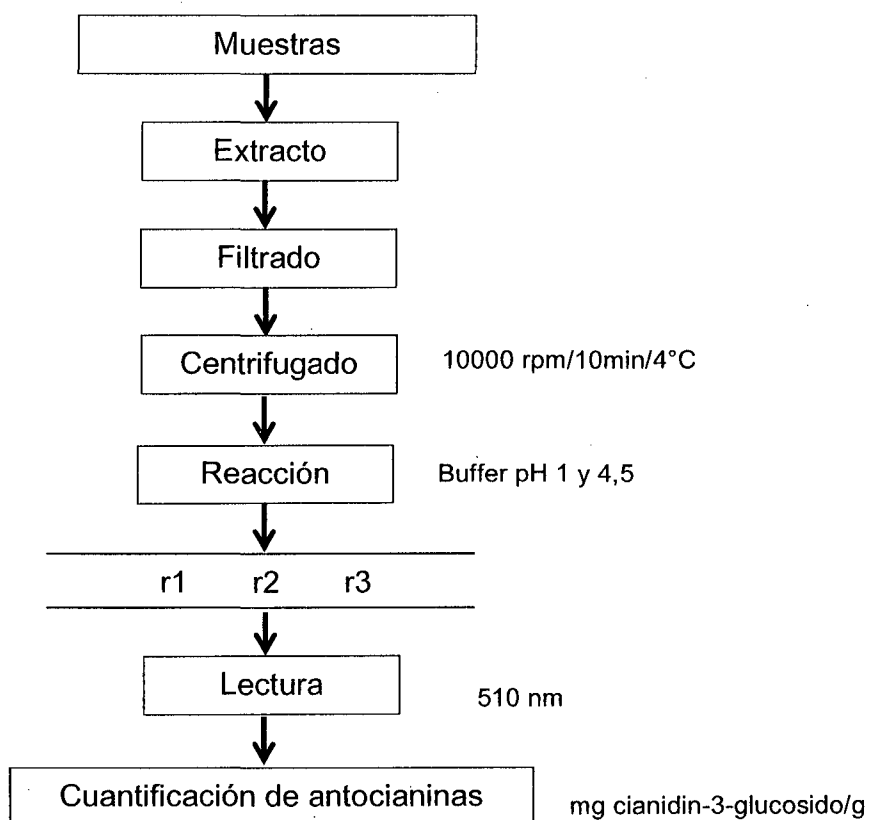
**484,82:** Es la masa molecular de la cianidina-3-glucósido.

**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. **FD:** Es el factor de dilución.

#### 3.5.4.2 Procedimiento de análisis

Para la cuantificación de antocianinas se muestra en la figura 4 , se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100mg/mL para las muestras (LC, ChT, PC Y CC), extracto hidroalcoholico 200 mg/mL para (PCh y GCh) y extracto acuoso de 30 mg/mL para las muestras (BLC, BPC y BChP), filtrado y centrifugado 10000rpm/10min a 4°C, se trabajó con 3 repeticiones por tratamiento, luego se hizo reaccionar con el buffer de pH 1 y pH 4,5 a 1mL para posterior realizar la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 510 nm y finalmente las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación (1) y expresadas en mg cianidin-3-glucosido/g de muestra.

Los resultados de la cuantificación de antocianinas fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) utilizando el programa estadístico del SAS versión 9.2.



**Figura 4.** Esquema experimental para la cuantificación de antocianinas.

### 3.5.5 Determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos preparados con polvo y licor de cacao.

#### 3.5.5.1 Capacidad de inhibir el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

La evaluación de la capacidad para inhibir el radical DPPH se muestra en la figura 5 y el procedimiento se describe a continuación. Se preparó una solución stock de DPPH a 1mM (0,004 g de DPPH en 10 ml de metanol (95%)) y se almacenó a 4 °C protegido de la luz. A partir de este stock se preparó 20 ml (100 µM DPPH) en metanol 95 %, que sirvió para hacer reaccionar con las

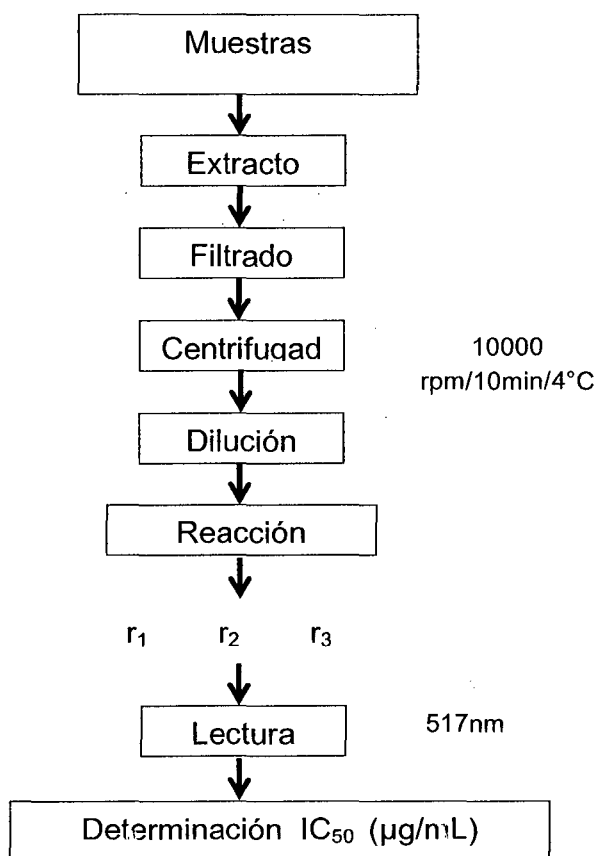


muestras. Para la inhibición del radical DPPH en las distintas muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao del extracto hidroalcohólico de 100 mg/ml (previamente filtrado, centrifugado y diluido), así como también de los extractos acuosos de 30 mg/ml, se prepararon soluciones de trabajo para cada muestra de alimentos preparados con licor y polvo de cacao tal como se muestra en el Cuadro 7. En una cubeta de poliestileno se agregó 25  $\mu$ l de muestra a 975  $\mu$ l de solución de 100  $\mu$ M DPPH, la inhibición de los radicales libres se determinó por la degradación del color violeta a amarillo, la cual fue leída a 515 nm cada 30 segundos por 10 min; la capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(Ac - Am(t)) / Ac] \times 100$$

Dónde: Ac : Absorbancia del control, DPPH (100  $\mu$ M). Am (t): Absorbancia de la muestra en función a tiempo (10 min).

A partir del porcentaje de inhibición se calculó  $IC_{50}$  (mg/mL) para ello se grafican los valores del porcentaje de inhibición en función a la concentración para cada extracto obteniendo así la ecuación de la gráfica, de la cual se obtendrá la concentración media efectiva. ( $IC_{50}$ ). Los resultados de la capacidad de inhibir ( $IC_{50}$ ) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) utilizando el programa estadístico del SAS versión 9.2.



**Figura 5.** Diseño experimental para la prueba de radical DPPH en muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

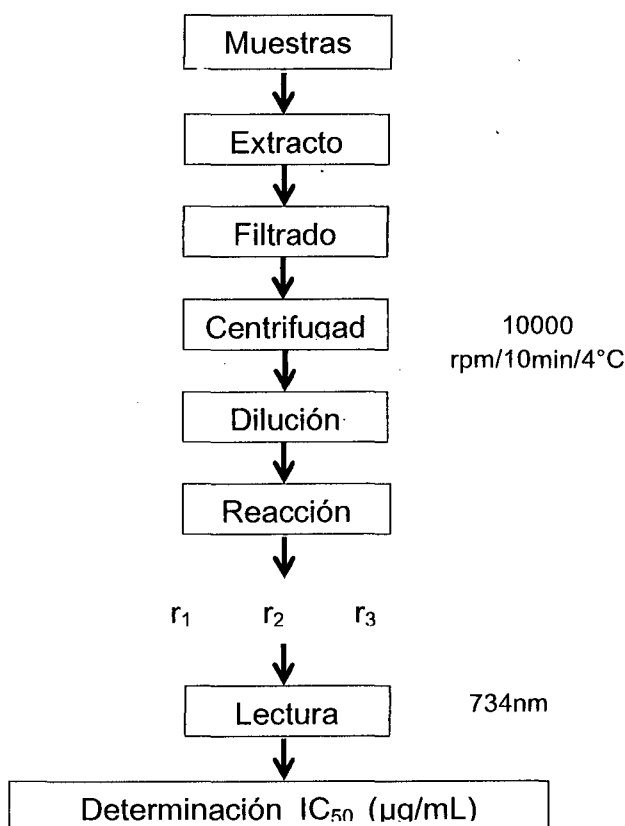
**Cuadro 7.** Preparación de las diluciones de trabajo para el radical DPPH en muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Muestras	Tipo	Concentraciones de trabajo				
	Extracto	( $\mu\text{g/ml}$ )				
ChT	Hidroalcoholico	4000	2000	1000	500	200
LC	Hidroalcoholico	4000	2000	1000	500	
PC	Hidroalcoholico	7000	4000	2500	1000	500
CC	Hidroalcoholico	20000	15000	7000	4000	1500
PCh	Hidroalcoholico	200000	150000	100000	60000	
GCh	Hidroalcoholico	200000	150000	100000	60000	
BLC	Acuoso	15000	9000	6000	3000	300
BPC	Acuoso	30000	9000	6000	3000	300
BChC	Acuoso	30000	9000	6000	3000	300

### 3.5.5.2 Capacidad de inhibir el radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS<sup>°+</sup>).

La evaluación de la capacidad para inhibir el radical ABTS se muestra en la figura 6 y el procedimiento se describe a continuación: El radical ABTS<sup>°+</sup> se formó tras la reacción de ABTS<sup>°+</sup> (7 mM) con persulfato potásico (140 mM) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS<sup>°+</sup> se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia entre 0,7 a 1,2. Para la inhibición del radical ABTS<sup>°+</sup> en muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao, se realizó a partir de los

extractos hidroalcoholico de 100 mg/mL (previamente filtrados, centrifugados y diluidos), así como también a partir de los extractos acuosos de 30mg/ml.



**Figura 6.** Diseño experimental para la prueba de radical ABTS<sup>°+</sup> en muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Se prepararon soluciones de trabajo para cada muestra tal como se muestra en el Cuadro 8. En una cubeta de poliestileno se agregó 10 µl de muestra a 990 µl del radical ABTS<sup>°+</sup>. La inhibición de los radicales libres se determinó por la degradación del color verde, la cual fue leída a 734 nm cada 30 segundos por 5 min. La capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición ABTS}^{\circ+} = [(A_c - A_{m(t)}) / A_c] \times 100$$

Dónde:  $A_c$  : Absorbancia del control,  $ABTS^{\circ+}$  .

$A_{m(t)}$  : Absorbancia de la muestra en función a tiempo (5 min)

A partir del porcentaje de inhibición se calculó  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para ello se grafican los valores del porcentaje de inhibición en función a la concentración para cada extracto obteniendo así la ecuación de la gráfica, de la cual se obtendrá la concentración media efectiva ( $IC_{50}$ ). Los resultados de la capacidad de inhibir ( $IC_{50}$ ) del radical  $ABTS^{\circ+}$  fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) utilizando el programa estadístico del SAS versión 9.2.

**Cuadro 8.** Preparación de las diluciones de trabajo para el radical  $ABTS^{\circ+}$  en muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Muestras	Tipo	Concentraciones de trabajo				
	Extracto	( $\mu\text{g/ml}$ )				
ChT	Hidroalcoholico	4000	3000	2000	500	
LC	Hidroalcoholico	5000	4000	3000	1000	300
PC	Hidroalcoholico	5000	3000	2000	1000	500
CC	Hidroalcoholico	15000	10000	4000	2000	1000
PCh	Hidroalcoholico	100000	60000	40000	20000	10000
GCh	Hidroalcoholico	100000	60000	40000	20000	10000
BLC	Acuoso	15000	9000	6000	3000	300
BPC	Acuoso	30000	9000	6000	3000	300
BChC	Acuoso	30000	9000	6000	3000	300

Con todos los resultados se procedió a realizar el análisis de componentes principales y conglomerados considerando todas las muestras y evaluaciones, el cálculo se realizó con el programa InfoStat versión 2011.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Cuantificación de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

#### 4.1.1 Determinación de la curva patrón

La curva patrón fue preparada considerando como estándar al ácido gálico para obtener un modelo matemático que sirvió de base para la cuantificación de polifenoles totales en las muestras de alimentos preparados con licor y polvo de cacao, donde las concentraciones estuvieron comprendidas entre 1 a 0,0625 mg/mL; los resultados de las absorbancias y la gráfica de la correlación se presentan en (A-I) y (A-II); la curva estándar de polifenoles fue elaborada con ácido gálico tal como lo recomienda **(WOLLGAST y ANKLAM. 2000)**.

Por otro lado se indica 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 **(ANDREW et al. 1989)**.

Realizando la regresión entre las absorbancia y la concentración de ácido gálico se encontró un  $r^2=0,999$ , la ecuación encontrada es de primer orden teniendo como variables "y" (absorbancia) y "x" (concentración), esta alta

correlación encontrada permite afirmar que la curva tuvo buen ajuste al modelo matemático, al respecto **MURRAY (1969)** indica que existe un buen grado de correlación entre las variables X e Y cuando el valor se acerca a 1.

#### 4.1.2 Cuantificación de polifenoles totales

En el Cuadro 9 y figura 7 se presenta los resultados del contenido de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao, realizando el análisis estadístico entre los tratamientos encontramos que existe diferencia significativa (A-III), comparando los promedios mediante la prueba de tukey ( $p \leq 0,05$ ) podemos apreciar que la muestra de **licor de cacao (LC)** tuvo el mayor contenido  $6,996 \pm 0,015$  gEAG/100g, cabe destacar que la empresa productora en sus especificaciones indica 100% de licor de cacao, como se sabe este producto se elabora a partir del grano de cacao tostado y molido, **CODEX STAN 141 (1983)** indica que el licor de cacao es el producto obtenido del cacao sin cáscara ni germen que se obtiene de vainas de cacao de calidad comercial, que ha sido limpiado y liberado de la cáscara del modo técnicamente más completo posible, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos constituyentes.

**KOWALSKA y SIDORCZUK (2007)** menciona que durante la producción de licor de cacao existe una gran reducción de la cantidad de contenido de polifenoles totales en los granos de cacao, sin embargo el valor encontrado en polifenoles en el licor de cacao es alto, puede deberse a lo reportado por **STAHL et al. (2009)** quien menciona que el contenido de polifenoles totales en productos derivados del cacao depende de varios factores, incluyendo la variedad de grano, manejo de poscosecha, fermentación, secado y tostado del mismo modo

**OTHMAN et al. (2007)**, reporta que el contenido de polifenoles en licor de cacao varía de acuerdo al país de origen así como también **COOPER et al. (2007)** menciona que las concentraciones de polifenoles depende de la fuente de grano y las condiciones en el procesamiento de chocolate.

En el licor de cacao se reporta  $6,996 \pm 0,015$  gEAG/100g, comparado a otras investigaciones se encuentra dentro del rango; **CHAVEZ y ORDOÑEZ (2013)** reporta  $5,689 \pm 0,153$  gEAG/100g; **PEREA-VILLAMIL et al. (2009)** en chocolate amargo  $3,398 \pm 3,13$  gEAG/100g; **RADOJCIC et al. (2009)**, reporta en diferentes muestras de licor de cacao Ecuador  $8,14 \pm 0,13$  g EAG/100g de muestra, Ghana  $4,01 \pm 0,04$  g EAG/100g de muestra, Madagascar  $12,65 \pm 0,31$  g EAG/100g de muestra, México  $8,37 \pm 0,15$  gEAG/100g de muestra, Sao Tome  $4,92 \pm 0,13$  gEAG/100g de muestra y Venezuela  $5,19 \pm 0,19$  gEAG/100g 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.

Según los resultados el **chocolate para taza** fue el que le siguió en el contenido de polifenoles al licor de cacao reportando  $6,269 \pm 0,009$  gEAG/100g, al respecto podemos indicar que según el **CODEX STAN 141 (1983)** el chocolate para taza debe contener cacao, azúcar y harina de trigo, arroz o maíz, la materia seca total de cacao  $\geq 14\%$ . De los resultados podemos indicar que en la etiqueta de venta del chocolate para taza sol de Tingo María se especifica que contiene licor de cacao 75%, manteca de cacao y cocoa en polvo, esto posiblemente sea la razón porque la muestra presentó un alto contenido de polifenoles totales; **ORDOÑEZ et al. (2012)**, reporta en chocolate para taza sol de Tingo María

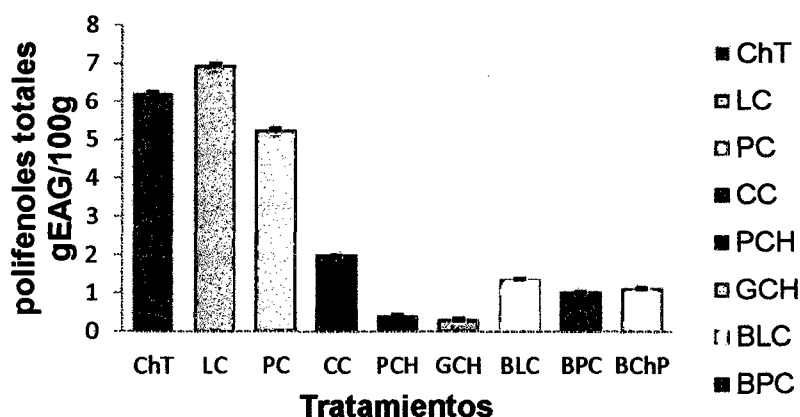


4,55±0,02 gEAG/100g y chocolates comerciales vario de 0,77±0,02 a 0,31 ±0,01 gEAG/100g. **PEREA-VILLAMIL et al. (2009)** en chocolate para taza con azúcar 1,256 ±1,99 gEAG/100g de muestra y en chocolate de mesa con canela y clavos 1,70±0,75 gEAG/g de muestra. **MILLER et al. (2006)** obtiene de 1,23 a 1,48 gEAG/100g, **VINSON et al. (2001)** obtiene un valor de 3,65 gEAG/100g.

**Cuadro 9.** Contenido de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Muestra	Cod.	Trat.	Polifenoles gEAG/100g
Chocolate para taza	ChT	T1	6,269 ± 0,009 <sup>b</sup>
Licor de cacao	LC	T2	6,996 ± 0,015 <sup>a</sup>
Polvo de cacao	PC	T3	5,284 ± 0,016 <sup>c</sup>
Cobertura de chocolate	CC	T4	2,029 ± 0,020 <sup>d</sup>
Pastel de chocolate	PCh	T5	0,431 ± 0,002 <sup>h</sup>
Galleta de chocolate	GCh	T6	0,339 ± 0,008 <sup>i</sup>
Bebida de licor	BLC	T7	1,402 ± 0,005 <sup>e</sup>
Bebida de polvo de cacao	BPC	T8	1,051 ± 0,004 <sup>g</sup>
Bebida de choc. para taza y polvo de cacao	BChP	T9	1,158 ± 0,003 <sup>f</sup>

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



**Figura 7.** Comportamiento de polifenoles totales en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Según los resultados del mismo cuadro y figura con respecto al contenido de **polvo de cacao** podemos indicar que este contiene  $5,284 \pm 0,016$  gEAG/100g; el **CODEX STAN (1981)** indica que el cacao en polvo es el producto obtenido de la torta de licor de cacao transformados en polvo. **FOLASADE et al. (2012)** y **STAHL et al. (2009)** mencionan que la cocoa o también llamada cacao en polvo o polvo de cacao se obtiene de los granos de cacao finamente molido, que son presionados para eliminar la mayor parte de la manteca de cacao, lo que resulta en un polvo que es típicamente 88 % a 90 % de sólidos no grasos y 10 % a 12 % de manteca de cacao. **Hill et al. (2009)** menciona que el procesamiento afecta a la cantidad de polifenoles presente en el polvo de cacao, reportando que el cacao en polvo natural muestra mayor contenido de polifenoles en comparación con el polvo de cacao alcalinizado. Esto podría ser debido al ajuste del pH por el álcali y la alta temperatura y la presión utilizado. **MILLER et al. (2006)** mostró que la alteración en el pH debido a la adición de álcali afecta el contenido total de polifenoles del cacao en polvo.

En la investigación el contenido de polifenoles en polvo de cacao fue ( $5,284 \pm 0,016$  gEAG/100g) se encuentra dentro rango; **Hill et al. (2009)** indica en polvo de cacao 6,50 g EAG/100g; **CROZIER et al. (2011)**  $4,82 \pm 2,1$  g /100 g y **PORTER et al, (1991)** 5,624 g EAG/100g de muestra.

Con respecto a la **cobertura de chocolate** se encontró  $2,029 \pm 0,020$  gEAG/100g de muestra, según las especificaciones del fabricante indica que la cobertura contiene licor de cacao 40% y 30% de mantaca de cacao; según **GARCÍA (2011)** establece una diferencia del chocolate normal y la cobertura que por su alto contenido en manteca de cacao, (nunca inferior al 31%), por lo que es brillante y funde con mucha facilidad, es muy manipulable. **CODEX STAN 87. (1981)** indica que el chocolate de cobertura debería contener, no menos del 35% de extracto seco total de cacao, del cual no menos del 31% será manteca de cacao y el 2,5%, por lo menos extracto seco magro de cacao. **PEREA-VILLAMIL et al. (2009)** reporta que el proceso de transformación del chocolate afecta en el contenido de los polifenoles totales debido a las etapas de procesamiento como el mezclado ya que al adicionar al licor de cacao ingredientes como azúcar y lecitina estos disminuyen el contenido de polifenoles, además menciona que las etapas de atemperado, moldeo y enfriado no presentan efecto sobre el contenido total de polifenoles.

Con respecto al **pastel de chocolate** que es el producto elaborado con harina, azúcar, margarina, polvo de hornear cocoa en polvo, cobertura de chocolate y fodge el contenido de polifenoles totales fue  $0,431 \pm 0,002$  gEAG/100g, este contenido menor puede deberse a la temperatura de horneado, pH de la masa y la cantidad de productos de cacao adicionados; según **STAHL et**

*al. (2009)* indica que los agentes de fermentación presentan variaciones en el pH del producto afectando así al contenido de los polifenoles totales en relación al flavonol, mostrando diferencias en los pasteles preparados con bicarbonato de sodio que es un compuesto alcalino y los preparados con polvo de hornear que es una mezcla de bicarbonato y diversos ingredientes ácidos; el mismo autor reporta para pastel de chocolate  $0,14 \pm 0,03$  gEAG/100g en polifenoles totales; comparando con este autor el contenido de polifenoles totales en el pastel es superior.

Según los resultados la **bebida de licor de cacao** se preparó adicionado agua, azúcar, canela, el contenido de polifenoles totales reportado fue  $1,402 \pm 0,005$  gEAG/100g, al respecto **LEE et al. (2003)** menciona que el método de extracción afecta al contenido de polifenoles y flavonoides, en polvo de cacao tuvo 2 gEAG/100g de muestra cuando se extrajo con metanol acuoso al 95 % y en una taza de cacao caliente tenía 14,6 gEAG/100g de muestra. El mismo autor afirma que factores tales como las condiciones experimentales, métodos de preparación de muestras, y la relevancia fisiológica de los ensayos deben ser considerados en la evaluación del contenido de polifenoles.

Analizando los resultados de la bebida de **chocolate para taza y polvo de cacao** se cuantificó  $1,158 \pm 0,003$  gEAG/100g de muestra de polifenoles totales, **STHAL et al. (2009)** menciona que las bebida calientes de cacao se prepararan combinando polvo de cacao con un ingrediente caliente.

Los resultados del contenido de polifenoles de la bebida preparada con la adición de polvo de cacao comparado a las otras dos bebidas fue el que tuvo el menor contenido  $1,051 \pm 0,004$  gEAG/100g de muestra; **CROZIER et al. (2011)**

analizo bebidas de polvo de cacao caliente las cuales se hicieron con polvo alcalinado, la alcalinización se utiliza para suavizar el sabor de cacao, sin embargo, el proceso se ha demostrado que aporta a la destrucción de compuestos polifenólicos, por lo cual señala que el alcance de la destrucción de polifenoles es proporcional al grado de alcalinización y el cambio en el pH del agua extraíble del polvo resultante en las bebidas de chocolate. Por otro lado, **STAHL et al. (2009)** reporta en bebidas de chocolate caliente un contenido de polifenoles totales de  $0,3 \pm 0,03$  mgEAG/g

De todos los alimentos preparados con licor y polvo de cacao las **galletas de chocolate** son las que tuvieron el menor contenido de polifenoles totales  $0,339 \pm 0,008$  gEAG/100g; esto puede deberse a que en su elaboración contienen polvo de cacao, harina, margarina, polvo de hornear azúcar y cobertura de chocolate, como podemos apreciar este producto lleva menos componentes de cacao y es sometido a horneado. **STAHL et al. (2009)** Indica que la temperatura es un factor crucial para la pérdidas de flavonoles en el proceso de horneado afectando así negativamente al contenido de polifenoles totales, así mismo sugiere en la preparación de pastel de chocolate un horneado de 121 a 177 °C ya que estas temperaturas no fueron de mucha influencia en la pérdida del contenido de polifenoles totales el mismo autor reporta en galletas de chocolate  $0,4 \pm 0,09$  gEAG/100g de muestra de polifenoles totales. **PEREA-VILLAMIL et al. (2009)** cita que el producto elaborado con cocoa en polvo y grasa vegetal presentó el menor contenido de polifenoles totales (4 veces menos que el chocolate amargo para taza).

#### 4.2 Cuantificación de antocianinas en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles de estructura O-glucósido formado por un aglucon (antocianidina) unido en forma glucosídica a uno o dos azúcares como glucosa, galactosa, xilosa o arabinosa. La cuantificación de las antocianinas en alimentos preparados con licor de cacao y polvo de cacao se presentan en el cuadro 10 y figura 8 en ella podemos apreciar que entre las muestras existe diferencia estadística significativa (A-IV) comparando los promedios mediante tukey ( $p \leq 0,05$ ) encontramos que la mayor cantidad de antocianinas se reportó en al **licor de cacao**  $0,147 \pm 0,003$  mg cianidina-3-glucósido/g de muestra y **chocolate para taza**  $0,145 \pm 0,001$  mg cianidina-3-glucósido/g de muestra; Al respecto podemos indicar que un grano sin fermentar tiene mayor contenido que un grano fermentado tal como indica **CUBERO et al. (1992)**, Sin fermentar 12 mg cianidina-3-glucósido/g y fermentado 1,72 mg cianidina-3-glucósido/g de muestra, en licor el contenido de antocianinas debe seguir disminuyendo tal como reporta **CHAVEZ (2012)** en licor de cacao  $0,162 \pm 0,007$  mg cianidina-3-glucósido/g de muestra, esto se debe a lo indicado por **BADUI (1988)** donde afirma que las antocianinas son sensibles al calor, oxígeno, a los metales y a los sulfitos. Para el caso del **polvo de cacao** ( $0,136 \pm 0,001$  mg cianidina-3-glucósido/g de muestra) podemos indicar que fue menor frente al chocolate para taza y licor de cacao, comparando nuestro resultado a polvo de cacao y cocoa con vainilla el contenido de antocianinas fue relativamente mayor. **CHAVEZ (2012)** en polvo de cacao reporta  $0,279 \pm 0,017$  mg cianidina-3-

glucósido/g de muestra y en polvo de cacao con vainilla  $0,182 \pm 0,017$  mg cianidina-3-glucósido/g de muestra.

Como podemos apreciar en el cuadro 10 y figura 8 con respecto a las **bebidas elaboradas con licor, polvo de cacao y chocolate para taza** estas tuvieron menor cantidad de antocianinas, sin embargo entre la bebida elaborada con licor de cacao  $0,118 \pm 0,001$  mg cianidina-3glucósido/g muestra y chocolate para taza  $0,111 \pm 0,0003$  mg cianidina-3glucósido/g muestra no presentaron diferencia estadística pero si se presentó esto en la bebida elaborada con polvo de cacao  $0,097$  mg cianidina-3glucósido/g muestra. Realizando la comparación del contenido de antocianinas de las bebidas con sus respectivas materias primas podemos indicar que la bebida de licor de cacao perdió 19,72%, bebida de chocolate para taza 23,44% y bebida de polvo de cacao 28,67 %, cabe aclarar que las bebidas elaboradas contenían agua y poca cantidad de sólidos, además fueron sometidas al calor y pudieron estos factores haber afectado la disminución del contenido de antocianinas, tal como lo cita **CERON (2008)** quien indica que las antocianinas son muy inestables y se degradan ante algunos factores como la temperatura ya que no deben exceder los  $40$  °C.

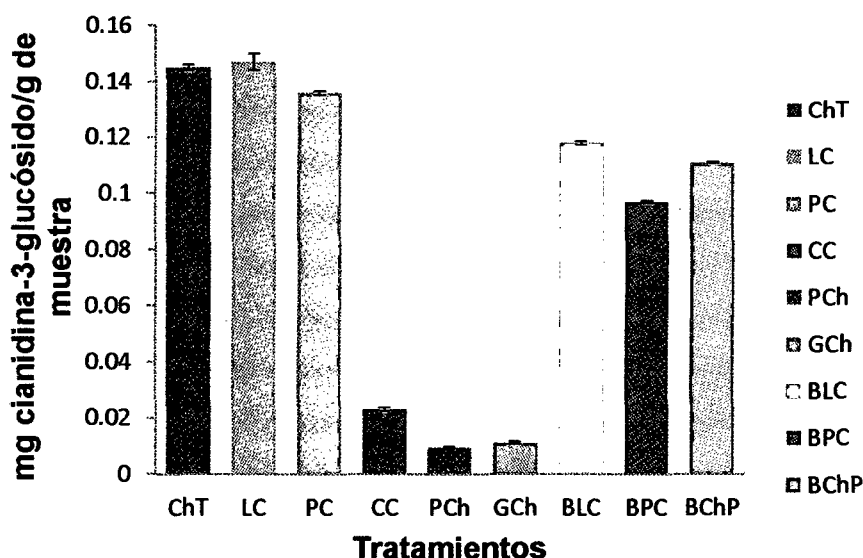
**Cuadro 10.** Cuantificación de antocianinas en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Muestra	Cód.	Tratamiento	mg cianidin-3-glucósido /g de muestra (*)
Chocolate para taza	ChT	T1	0,145 ± 0,001 <sup>a</sup>
Licor de cacao	LC	T2	0,147 ± 0,003 <sup>a</sup>
Polvo de cacao	PC	T3	0,136 ± 0,001 <sup>b</sup>
Cobertura de chocolate	CC	T4	0,023 ± 0,001 <sup>e</sup>
Pastel de chocolate	FCh	T5	0,009 ± 0,000 <sup>f</sup>
Galleta de chocolate	GCh	T6	0,011 ± 0,001 <sup>f</sup>
Bebida de licor	BLC	T7	0,118 ± 0,001 <sup>c</sup>
Bebida de polvo de cacao	BPC	T8	0,097 ± 0,000 <sup>d</sup>
Bebida de choc. para taza y polvo de cacao	BChP	T9	0,111 ± 0,000 <sup>c</sup>

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

(\*) Reportado por (POO, 2005).





**Figura 8.** Comportamiento de la cuantificación de antocianinas en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Como podemos apreciar el contenido de antocianinas en la **cobertura de chocolate** fue menor al de las bebidas  $0,023 \pm 0,001$  mg cianidina-3glucósido/g muestra, este bajo contenido de antocianinas posiblemente se debe a lo reportado por **BECKETT (1994)** que indica que las coberturas estas elaboradas con un contenido graso de 50-70%, y puede llevar polvo de cacao o pasta de cacao.

Como podemos apreciar en el cuadro 10 y figura 8 el menor contenido de antocianinas lo presento **pastel de chocolate**  $0,009 \pm 0,000$  mg cianidina-3glucósido/g muestra y la **galleta de chocolate**  $0,011 \pm 0,001$  mg cianidina-3glucósido/g muestra, realizando la comparación frente al licor de cacao el contenido de antocianinas en pastel de chocolate perdió 93,38% y en la galleta de chocolate 91,91%, está perdida grande se debe posiblemente a lo citado por

**ASTRID (2008)**, que 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.

#### **4.3 Determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos preparados con polvo y licor de cacao.**

##### **4.3.1 Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)**

Muchos antioxidantes naturales son multifuncionales y su actividad es compleja en alimentos y no puede ser evaluado con métodos simples, por esta razón en el trabajo se utilizó el DPPH y ABTS ambos métodos permiten dar información de la capacidad antioxidante de los alimentos preparados con licor y polvo de cacao. El valor de  $IC_{50}$  es la cantidad de antioxidante necesario para decrecer la concentración inicial del DPPH hasta el 50%, estos resultados se presentan en el cuadro 11 y figura 9, realizando el análisis estadístico se encontró que entre los tratamientos existe diferencia estadística (A-V), comprando los promedios mediante la prueba de tukey ( $p \leq 0,05$ ) se encontró que las mayor eficiencia frente al radical DPPH fue para las muestra de licor de cacao (LC), chocolate para taza (ChT) y polvo de cacao (PC).

Como se sabe el **licor de cacao**  $IC_{50}$   $41,56 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$  es el primer producto del procesamiento de los granos de cacao, esta debe ser la razón de tener buena eficiencia frente al radical DPPH, según las revisiones consultadas sobre el licor afirma **RADOJCIC et al. (2009)** que además de los compuestos fenólicos, la presencia de metilxantina (teobromina y la cafeína) y antocianinas en los granos de cacao puede influir en la capacidad antioxidante. **MILLER et al.**

(2006) menciona que los granos de cacao son una fuente concentrada de antioxidantes y flavonoides, con la flavan-3-oles y sus derivados está presente en altas concentraciones; además indica que la capacidad antioxidante puede ser afectada por muchos factores como el tostado, proceso de fermentación porque en estas etapas decrece el contenido de flavonol en los granos de cacao.

Comparando el  $IC_{50}$  del licor de cacao elaborado con granos de cacao de la zona de Tingo María y Tarapoto nos encontramos dentro del rango reportado por otros autores como **PEREA-VILLAMIL et al. (2009)** en chocolate amargo obtiene  $IC_{50}$   $0,40 \pm 0,06$  mg/ml; **CHAVEZ (2012)** determino un  $IC_{50}$  para licor de cacao  $IC_{50}$   $52,930 \pm 0,340$  ug/ml. **RADOJCIC et al. (2009)** en licores de cacao elaborados con granos de diferentes países el orden de la capacidad antioxidante fue Madagascar  $IC_{50}$   $4,82 \pm 0,23$  mg /m > México > Ecuador > Venezuela > Sao Tome > Gahana  $IC_{50}$   $11,01 \pm 0,77$  mg /mL; **TABERNERO et al. (2006)** reporta  $IC_{50}$   $1,68 \pm 0,02$  mg /mL.

La capacidad antioxidante frente al radical DPPH en **chocolate para taza** se obtuvo un  $IC_{50}$   $49,63 \pm 0,03$   $\mu$ g/mL, según la especificación de ingredientes esta muestra fue elaborado en Cooperativa Agroindustrial Naranjillo Ltda. La que especifica un contenido de licor de cacao de 75%, se sabe que a mayor cantidad de polifenoles mayor capacidad antioxidante. Al respecto **RADOCIC et al. (2009)** determinó que la capacidad antioxidante está relacionado con el contenido de polifenoles reportando una correlación de  $r^2=0,9868$  de DPPH; **BELSCAK et al. (2009)**, indican que la capacidad antioxidante está dada por los polifenoles totales, monómeros flavonol (epicatequina y catequina) y proantocianinas, estos compuestos son considerados como candidatos potenciales para combatir los

radicales libres; **OLIVIERO et al. (2009)** indica que el tostado de los granos afecta a los compuestos fenólicos con propiedad antioxidante disminuyendo rápidamente, porque sucede una oxidación, condensación de compuestos fenólicos que son responsables de las características de color pardo, aroma y textura de los granos.

Comparando nuestro resultados con los reportes de otros autores nos encontramos dentro del rango; **ORDOÑEZ et al. (2012)** en chocolates para taza encontró que la mayor eficiencia frente a este radical lo presentó la muestra T3 (chocolate sol de Tingo María)  $IC_{50}$   $0,1246 \pm 0,001$  mg/mL y el menor para (sol del cuzco)  $IC_{50}$   $1,1846 \pm 0,019$  mg/mL; **PEREA-VILLAMIL et al. (2009)** en chocolate para taza obtiene  $IC_{50}$   $1,20 \pm 0,17$  mg/mL y chocolate con clavo y canela  $IC_{50}$   $1,27 \pm 0,20$  mg/mL.

Del mismo cuadro y figura podemos indicar que la capacidad antioxidante para el **polvo de cacao** fue  $IC_{50}$   $54,83 \pm 0,23$   $\mu$ g/mL, como sabemos este tiene comportamiento similar al chocolate para taza el cual contiene 75% de licor de cacao, esto puede ser explicado por **ANDRES-LACUEVA et al. (2008)** quien analizó los cambios de flavanol y flavonol durante el proceso de fabricación de productos de cacao en polvo, que resulta del licor de cacao en el cual parte de la manteca se elimina, se muele y resulta un polvo que contiene 10 a 12 % de grasa (cacao en polvo natural). **MALEYKI and ISMAIL (2010)** indican que la capacidad antioxidante en el polvo de cacao es contribuida por la presencia de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides (+)-catequina, (-)-epicatequina, dímeros y trímeros).

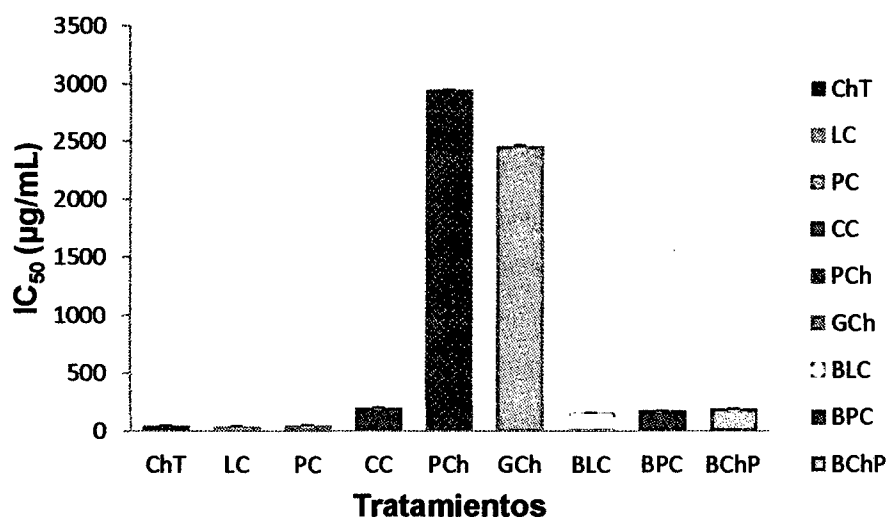
Comparando nuestros resultados podemos indicar que nos encontramos dentro de los rangos reportados por **CHAVEZ (2012)** determino un  $IC_{50}$  para polvo de cacao 57  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; **TABERNEIRO et al. (2006)** reporta en CPS1  $IC_{50}$  13,23  $\pm$  1,10 mg /mL y en CPS2  $IC_{50}$  7, 11 mg/ml; **ANDRES-LACUEVA et al. (2008)** la cantidad de quercetina por porción proporcionado por el polvo de cacao (0,083 a 1,3 mg para una porción de 20 g ) tuvo mayor capacidad antioxidante que la de las fuentes de alimentos antes mencionados, brócoli ( 1,82-7,04 mg para una porción de 200 g ) , manzanas con piel ( 3,14-8,80 mg en un 200 g de porción ) , y las uvas rojas ( 0,00-7,96 mg en un 200 g por ración).

**Cuadro 11.** Resultados del  $IC_{50}$  del radical DPPH en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Muestra	Código	Trat.	$IC_{50}(\mu\text{g}/\text{mL})$	Eficiencia $1/IC_{50} (*)$
Chocolate para taza	ChT	T1	49,63 $\pm$ 0,03 <sup>gf</sup>	0,0201
Licor de cacao	LC	T2	41,56 $\pm$ 0,08 <sup>g</sup>	0,0240
Polvo de cacao	PC	T3	54,83 $\pm$ 0,23 <sup>f</sup>	0,0182
Cobertura de chocolate	CC	T4	202 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	0,0049
Pastel de chocolate	PCh	T5	2951,01 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	0,0003
Galleta de chocolate	GCh	T6	2461,34 $\pm$ 5,47 <sup>b</sup>	0,0004
Bebida de licor	BLC	T7	158,91 $\pm$ 0,40 <sup>e</sup>	0,0062
Bebida de polvo de cacao	BPC	T8	176,86 $\pm$ 0,37 <sup>d</sup>	0,0056
Bebida de choc. para taza y polvo de cacao	BChP	T9	193,81 $\pm$ 0,30 <sup>c</sup>	0,0051

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

(\*) Reportado por RADOJCIC et al. (2009)



**Figura 9.** Comportamiento del IC<sub>50</sub> del radical DPPH en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Según los resultados del cuadro para **bebida de licor de cacao** el IC<sub>50</sub>  $158,91 \pm 0,40 \mu\text{g} / \text{mL}$  teniendo mayor actividad antioxidante comparado a la bebida elaborado con polvo de cacao y chocolate para taza y polvo de cacao, esta bebida se elaboró con licor de cacao, azúcar, canela y clavo todos los ingredientes fueron mezclados y sometidos en agua a ebullición por 2 minutos. Cabe resaltar que el contenido de polifenoles en licor de cacao fue alto tal como cita **RADOJCIC et al. (2009)** en el licor de Madagascar  $12,65 \pm 0,31 \text{ mg EEC/ g}$  y el menor Gahana  $4,01 \pm 0,04 \text{ mg EEC/ g}$ ; **FOLASADE et al. (2012)** reporta en bebidas elaboradas con cocoa (natural y alcalinizada), zobo y Kion frente al radical DPPH no presentaron diferencias estadísticas el rango fue de 22,6 % a 25,8%, frente a un patrón que tuvo 37,4 %. **STHAL et al. (2009)** indica que el chocolate frostyn elaborado con cocoa, leche o mantequilla y otros ingredientes tuvo la mayor

actividad antioxidante en ORAC  $79 \pm 4$   $\mu\text{Mol TE/g}$  comparado a la bebida de cocoa caliente  $40$   $\mu\text{Mol TE/g}$ .

Del Cuadro 11 y Figura 9 podemos observar que la **bebida de polvo de cacao** tuvo un  $\text{IC}_{50}$   $176,86 \pm 0,37$   $\mu\text{g /mL}$ , teniendo menor capacidad antioxidante que la bebida elaborada con licor de cacao, cabe resaltar que esta bebida fue elaborada mezclando polvo de cacao, azúcar, canela y clavo de olor como aromatizantes y agua caliente en ebullición; Al respecto **CROZIER et al. (2011)** comparó el cacao en polvo con polvos y jugos derivados de frutas y se observó que el polvo de cacao es el que tiene una mejor capacidad antioxidante obteniendo así un valor de  $634 \pm 33$   $\text{uMTE/g}$ . Es importante señalar que el polvo de cacao utilizado en este estudio fue natural (no alcalinizada). **FOLASADE et al. (2012)** realizando el análisis mediante el radical superóxido en bebidas elaboradas con cocoa, zobo y Kion demostró que la cocoa al 100% tuvo la mayor capacidad de inhibir a este radical, comparado a la bebida de Kion al 100%.

Según los resultados para la **bebida de chocolate para taza y polvo de cacao** el  $\text{IC}_{50}$   $193,81 \pm 0,30$   $\mu\text{g/mL}$ , como podemos apreciar entre las tres bebidas esta tuvo la menor capacidad antioxidante, en esta bebida se incluyó chocolate para taza y polvo de cacao ambos tuvieron menor contenido de polifenoles totales, además puede haber influido el método de extracción ya que en la investigación se trabajó con extracto acuoso; **OTHMAN et al. (2007)** sugiere que la alta capacidad para captar radicales DPPH en extractos de cacao no es solo exclusivo de los polifenoles, así mismo, puede influenciar la concentración del antioxidante, método de extracción, temperatura, pH, estructura química y posición de la molécula.

Según los resultados la actividad antioxidante de la **cobertura de chocolate** fue  $IC_{50} 202 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ , comparando a los resultados de chocolate para taza, licor de cacao y polvo de cacao este tuvo menor eficiencia frente al radical DPPH; según la información de la empresa productora indica que este producto contienen 45% de licor de cacao y 30 % de grasa, según **BELSCAK et al. (2009)** mencionan en sus resultados un orden decreciente de extractos de productos de cacao basado en la capacidad antioxidante evaluado con el ensayo FRAP, siguiendo el comportamiento observado en el contenido de polifenoles totales con el ensayo de Folin-Ciocalteu: licor. de cacao > cacao polvo > chocolates con 88%, 72% y 60% de sólidos de cacao > chocolate en polvo > barra de cacao > chocolate con leche. **VINSON et al. (1999)** menciona que el chocolate semiamargo contiene al menos 15% de licor de chocolate, pero puede contener hasta 60%, siendo el resto de manteca de cacao, azúcar y otros aditivos lo que contribuye a que la capacidad antioxidante en estos productos sea menor.

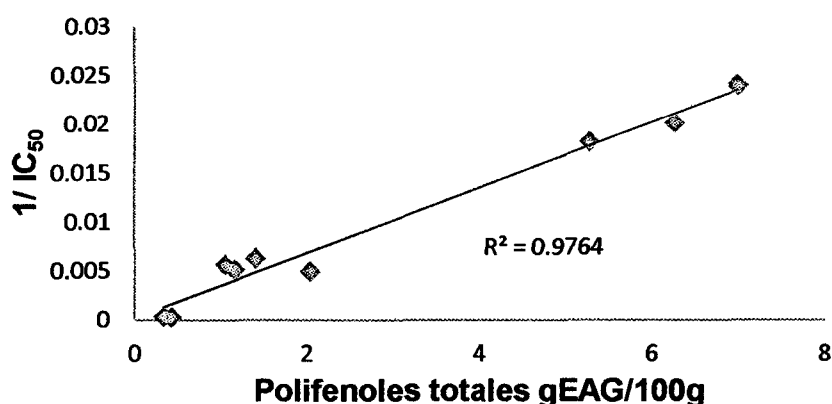
Analizando los resultados del Cuadro 11 y Figura 9 podemos indicar que la **galleta de chocolate** alcanzó poca eficiencia frente al radical DPPH  $IC_{50} 2461,34 \pm 5,47 \mu\text{g/mL}$ , este producto en su elaboración incluyo polvo de cacao y cobertura de chocolate y se horneó a  $175^{\circ}\text{C}/15 \text{ min}$ , al respecto **STAHL et al. (2009)** indica que en los productos horneados como tortas y galletas se disminuye la actividad antioxidante debido al proceso de horneado ya que las temperaturas altas causan un afecto negativo.

Del análisis estadístico realizado según la prueba de tukey el **pastel de chocolate** fue el que tuvo la menor eficiencia frente al radical DPPH  $IC_{50} 2951,01$



$\pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ , cabe resaltar que en la elaboración de este pastel se incluyó polvo de cacao, cobertura de chocolate, fodge para la decoración y polvo de hornear, la menor actividad antioxidante puede deberse a la temperatura de horneado  $175^\circ\text{C}/45 \text{ min}$ , además este producto también tuvo la menor cantidad de polifenoles comparado al licor, polvo de caca, chocolate para taza. Al respecto **STAHL et al. (2009)** indican que en el pastel de chocolate elaborado con bicarbonato de sodio elevan el pH hasta 8,81, este es un riesgo porque se baja los niveles de los químicos relacionados a la actividad antioxidante; además este pastel mostro la menor cantidad de (-)-epicatequina (flavonol monómeros)  $0,01 \text{ mg/g}$ , polifenoles totales  $1,44\pm 0,3 \text{ mg EAG/g}$ , ORAC  $23\pm 4 \mu\text{MTE/g}$ , comparado al chocolate frostin, cocoa caliente, galleta de chocolate.

Con los resultados presentados en la figura 10 referente al contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante frente al radical DPPH se realizó la correlación logrando un  $r^2 = 0,9764$ , este alto coeficiente quiere así decir que el contenido de polifenoles totales es predominante en la capacidad antioxidante, al respecto **RADOJCIC et al. (2009)** indica según su análisis de correlación entre la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles  $r^2 = 0,9868$ ; Así mismo, se ha reportado en muchos otros estudios análisis similares con alta correlación como **ADAMSON et al. (1999)**; **CUNET et al. (2004)**; **NINFALI et al. (2005)**; **MILLER et al. (2006)**. La alta correlación entre el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante permite sugerir que los compuestos dominantes que contribuyen a dicha capacidad son de estructura polifenólica.



**Figura 10.** Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante (DPPH)

#### 4.3.2 Capacidad de inhibir el radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6-ácido sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>).

La evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de un alimento debe realizarse utilizando por lo menos dos radicales, al respecto en la investigación se consideró al DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, los resultados de este último radical en la evaluación de alimentos preparados con licor y polvo de cacao se presenta en el cuadro 12 y figura 11, realizando el análisis estadístico se encontró diferencia significativa (A-VI) de estos podemos indicar que la mayor capacidad para inhibir al radical ABTS lo presentó el **licor de cacao** IC<sub>50</sub> 38,57 ± 0,14 µg/mL, esta mayor capacidad de inhibir al radical puede ser explicado por **WAN et al. (2009)** que informó que el chocolate negro contiene catequinas (un grupo de compuestos flavonoides flavan-3-ol) a una concentración media de 0,535 mg / g, 4 veces la de té 139 mg /g. El ensayo de ABTS<sup>•+</sup> puede ser preferible sobre el ensayo de DPPH para evaluar el total de capacidad antioxidante de los alimentos, muchos

estudios han considerado las frutas, verduras y tés que son las principales fuentes de compuestos fenólicos antioxidantes en la dieta, pero nuestros resultados también demuestran la importancia de cacao **LEE et al. (2003)**.

Comparando nuestro resultado con lo reportado por **CHAVEZ (2012)** en licor de cacao  $IC_{50}$   $36,850 \pm 1,436$   $\mu\text{g/mL}$  podemos decir que hubo menor eficiencia frente a este radical. Además existe otras informaciones como **TABERNEIRO et al. (2006)** que indica en licor de cacao  $290,29$   $\mu\text{molTE/g}$ , en chocolate negro  $78,80$   $\mu\text{molTE/g}$ . **MILLER et al. (2008)** en chocolate negro ORAC  $151,7 - 246,0$   $\mu\text{molTE/g}$ . **RADOJCIC et al. (2006)** en muestras de licor de cacao de distintos países obtiene valores en ORAC de  $347,90 \pm 16,03$   $\mu\text{molTrolox/g}$  de muestra a  $1425,82 \pm 21,36$   $\mu\text{molTrolox/g}$  de muestra; **BELSCAK et al. (2009)** en licor de cacao obtiene  $20,16 \pm 0,10$   $\text{mmol/L}$  Trolox en extracto acuoso y  $17,63 \pm 0,12$   $\text{mmol/L}$  Trolox en extracto metanólico, todos demuestran una buena capacidad antioxidante para el licor de cacao.

Según el cuadro de resultados la capacidad antioxidante frente al radical  $\text{ABTS}^{\circ+}$  para el **chocolate para taza** y el **polvo de cacao** fue estadísticamente igual, para el polvo de cacao se tuvo  $IC_{50}$   $40,34 \pm 0,02$   $\mu\text{g/mL}$  esto indica que tiene buena eficiencia para inhibir al radical, según **NATZUME et al. (2000)** el polvo de cacao es el producto del procesamiento del cacao que puede ser alcalinizado o no en la cual se remueve la grasa a temperatura alta y se realiza una molienda para lograr un tamaño de partícula pequeño. **CROZIER et al. (2011)** el polvo de cacao y chocolate negro reporta concentraciones relativamente altas de ciertos compuestos polifenólicos, sobre todo flavanoles como epicatequina, especialmente el monómero y oligómeros y polímeros de flavanoles

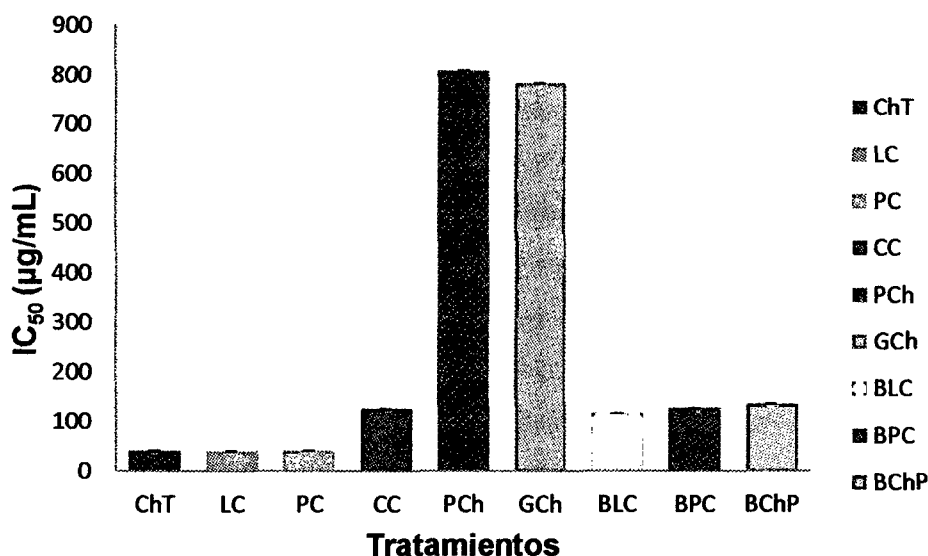
llamados proantocianinas y estos pueden actuar como antioxidantes fuertes en los sistemas alimentarios.

Comparando nuestro resultado podemos indicar que el **polvo de cacao** tuvo menor capacidad antioxidante que lo reportado por **CHAVEZ (2012)** en polvo de cacao  $IC_{50}$   $38,639 \pm 1,315 \mu\text{g/mL}$  y en cocoa con vainilla  $IC_{50}$   $39,323 \pm 1,439 \mu\text{g/mL}$ . **BELSCAK et al. (2009)** en polvo de cacao obtiene  $20,19 \pm 0,10 \text{ mmol / L}$  de Trolox, con extracto metanolico y con extracto acuoso  $18,14 \pm 0,06 \text{ mmol / L}$  de Trolox.

**Cuadro 12.** Resultados del  $IC_{50}$  del radical  $ABTS^{\circ+}$  en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Muestra	Código	Tratamiento	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
Chocolate para taza	ChT	T1	$40,35 \pm 0,07^g$
Licor de cacao	LC	T2	$38,57 \pm 0,14^h$
Polvo de cacao	PC	T3	$40,34 \pm 0,02^g$
Cobertura de chocolate	CC	T4	$124,56 \pm 0,06^e$
Pastel de chocolate	PCh	T5	$807,40 \pm 0,15^a$
Galleta de chocolate	GCh	T6	$781,99 \pm 0,64^b$
Bebida de licor	BLC	T7	$116,16 \pm 0,05^f$
Bebida de polvo de cacao	BPC	T8	$125,71 \pm 0,09^d$
Bebida de choc. para taza y polvo de cacao	BChP	T9	$134,32 \pm 0,03^c$

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 11.** Comportamiento del IC<sub>50</sub> del radical ABTS en alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

Realizando la evaluación para el **chocolate para taza** obtuvo un IC<sub>50</sub>  $40,35 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$  que tiene una capacidad antioxidante similar al polvo de cacao podemos decir que esta alta actividad posiblemente se debe a que el chocolate para taza contiene 75% de licor de cacao; **ORDOÑEZ et al. (2013)** en chocolate para taza obtuvo la mayor capacidad antioxidante con un valor de IC<sub>50</sub>  $38,77 \pm 0,508 \mu\text{g/mL}$  y una menor con un valor de IC<sub>50</sub>  $409,22 \pm 8,579 \mu\text{g/mL}$ . **TABERNEIRO et al. (2006)** también indica que el chocolate para taza tiene buena capacidad antioxidante y su reporte es de  $78,80 \pm 2,13 \mu\text{molTE/g}$ . **BELSCAK et al. (2009)** en chocolate con un 88% de pasta de cacao obtuvo  $20,40 \pm 0,06 \text{ mmol / L}$  en extracto acuoso mientras que en extracto metanólico obtuvo  $18,71 \pm 0,29 \text{ mmol / L}$ .

Realizando la comparación entre las bebidas elaboradas con derivados del cacao, podemos encontrar que la mayor eficiencia frente al radical ABTS<sup>o+</sup> lo tuvo la **bebida elaborado con licor** IC<sub>50</sub> 116,16 ± 0,05 µg/mL, seguido por la **bebida con polvo de cacao** IC<sub>50</sub> 125,71 ± 0,09 µg/mL y el menor correspondió a la **bebida elaborado con chocolate para taza y polvo de cacao** IC<sub>50</sub> 134,32 ± 0,03 µg/mL, todas estas muestras fueron evaluados en extracto acuoso, además cada bebida tuvo una formulación para su elaboración conteniendo poca cantidad de licor, chocolate para taza y polvo de cacao en relación a la cantidad de agua, según **VINSON et al. (1999)** menciona que las bebidas calientes del cacao estaban muy bajas en polifenoles, tal como se esperaba debido a la baja cantidad de sólidos del cacao en las muestras de bebida caliente de chocolate. Además **FOLASADE et al. (2012)** reporta el valor de FRAP de polvo de cacao natural estuvo alrededor de 60% mucho más alto que la bebida elaborada con cocoa alcalinizada, y la bebida de kion fue la que tuvo menor eficiencia frente a este radical.

Del mismo cuadro y figura con respecto a la **cobertura de chocolate** frente al radical ABTS<sup>o+</sup> esta tuvo un IC<sub>50</sub> 124,56 ± 0,06 µg/mL, muy similar a la bebida de chocolate, como sabemos las bebidas fueron evaluadas en extracto acuoso y la cobertura en extracto metanólico, este comportamiento puede deberse a al tipo de extracto; **BELSCAK et al. (2009)** menciona que los extractos tanto metanol y acuoso tienen un alto potencial de inhibir antioxidantes, pero la eficiencia de captación de radicales difiere notablemente con respecto a cada producto de cacao.

En el cuadro 12 y figura 11 Se presenta los resultados de la concentración necesaria para inhibir el 50% de del radical ABTS<sup>°+</sup> de la muestra de **galleta de chocolate**  $IC_{50}$   $781,99 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$  como se puede apreciar esta tuvo mejor capacidad para inhibir el radical frente a la muestra de **pastel de chocolate**  $IC_{50}$   $807,40 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ , cabe resaltar que ambos productos fueron elaborados con polvo de hornear con la finalidad de mantener el pH menor a 7,5 al respecto **STAHL et al. (2009)** Indica que los agentes como el bicarbonato de sodio y polvo de hornear influyen directamente en el pH y a  $\text{pH} > 7,5$  se tiene mejor color y volumen, pero la actividad antioxidante disminuye teniendo así: con polvo de hornear ORAC  $42 \pm 2 \mu\text{MTE/g}$  y con bicarbonato de sodio ORAC  $23 \pm 4 \mu\text{MTE/g}$ , en (-)-epicatequina se tiene para polvo de hornear  $0,20 \pm 0,00 \text{ mg/g}$  mientras que para bicarbonato de sodio se tiene  $0,01 \pm 0,00 \text{ mg/g}$ .

Para el caso del pastel este fue horneado a  $165^\circ/45\text{min}$  y la galleta a  $165^\circ/15 \text{ min}$ , como podemos apreciar para el pastel el tiempo de horneado fue mayor, posiblemente el efecto de la temperatura pudo haber afectado la capacidad antioxidante tal como lo explica **STAHL et al. (2009)** quien comparando las galletas de chocolate con el pastel de chocolate que este último es más afectado en la actividad antioxidante, polifenoles totales, flavonoles y procianidinas por la temperatura de horneado sugiriendo que debe realizarse el horneado en un rango de temperatura de 121 a  $177^\circ\text{C}$

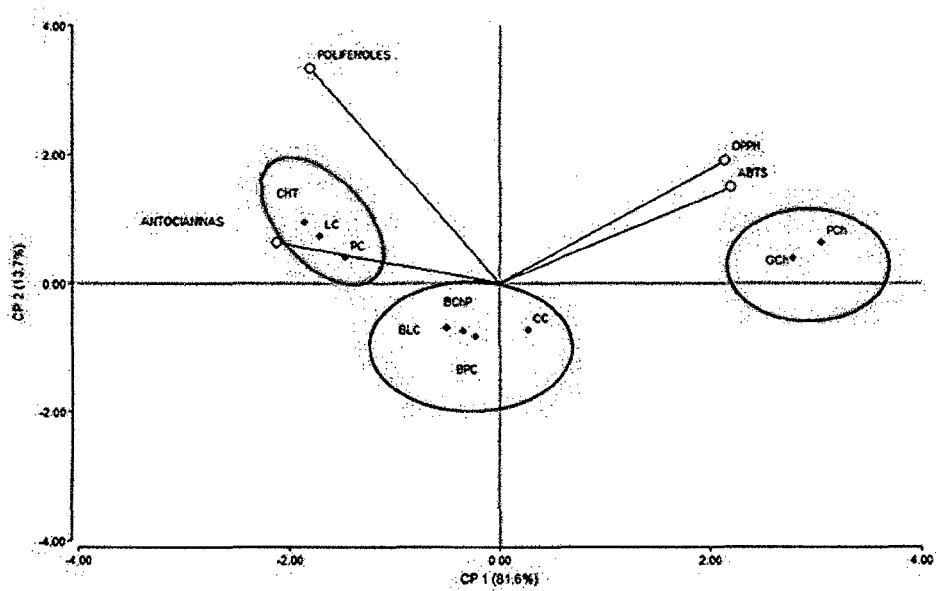
#### 4.4 Análisis multivariado – componentes principales

Para poder evaluar el comportamiento de los polifenoles totales, antocianinas, actividad antioxidante mediante los radicales de DPPH y ABTS<sup>o+</sup> en los diferentes alimentos preparados con licor y polvo de cacao se realizó el análisis de componentes principales, los resultados del análisis estadístico se presentan en el A-VII.

En la figura 12 se presenta el biplot de variables del primer componente (CP1) que separa la antocianina del resto de variables (polifenoles, DPPH, ABTS<sup>o+</sup>), representando el 81,6 % de la variabilidad total entre los indicadores de calidad de los 9 tratamientos analizados. Así mismo, los polifenoles representa el 13,7 % de la variabilidad en el segundo componente (CP2) y ambos componentes representan el 95,3 % de la variabilidad total.

Observado la figura podemos indicar que el CP1 está asociado a la prueba de antocianinas, **MILLER et al. (2006)** menciona que en los distintos procesos de transformación de granos frescos a productos terminados la concentración de antocianinas puede ser afectada por una variedad de condiciones biológicas y de procesamiento, Así mismo **FOLASADE et al. (2012)** hace referencia que las pérdidas de polifenoles se producen durante el tostado, así como en el procesamiento de alcalinizado de polvo de cacao y al someter a horneado con agentes leudantes alcalinos, esto puede explicar la pérdida de antocianinas que los alimentos preparados sufren al ser sometidos a diversos procesos.



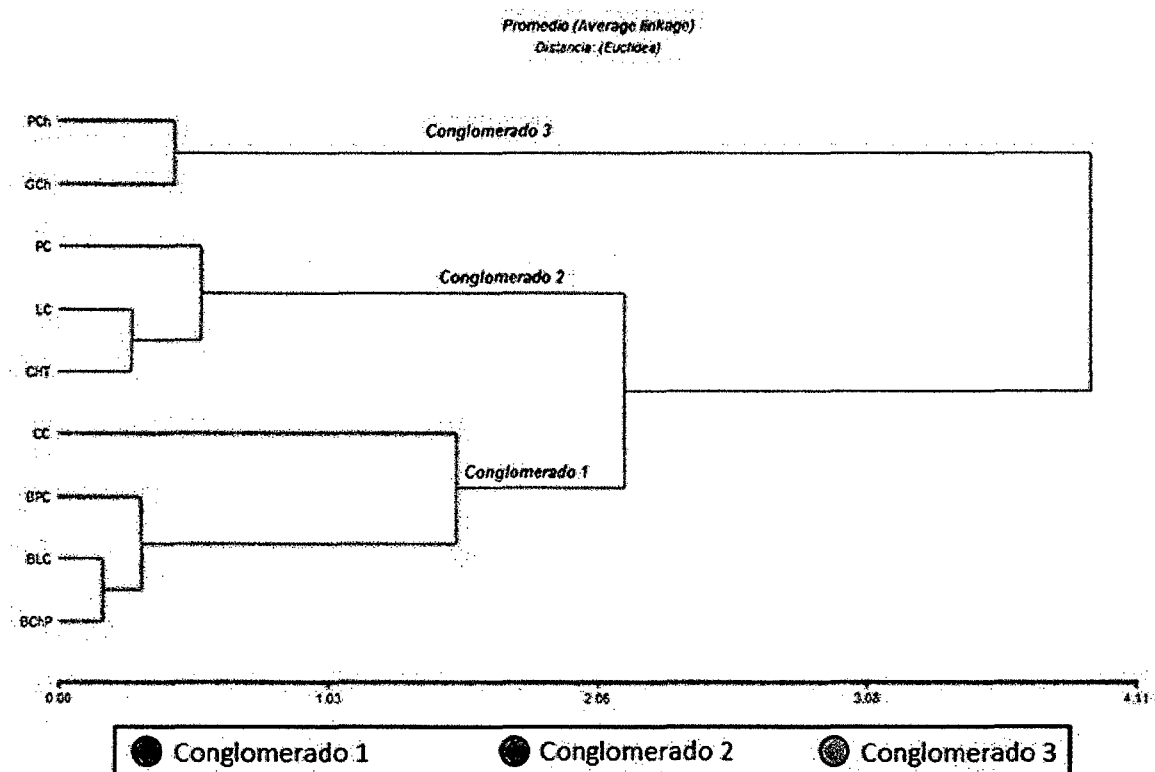


**Figura 12.** Comportamiento del biplot de polifenoles totales, antocianinas, radicales de DPPH y ABTS<sup>•+</sup> en los diferentes alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

El CP2 se ve relacionada con el análisis de los polifenoles, del cual podemos mencionar que el contenido de polifenoles también influye en la capacidad antioxidante, al respecto **MILLER et al. (2009)** y **Hill et al. (2009)**, reportan que el cacao y sus productos derivados como el polvo de cacao, licor de cacao y chocolates tienen diferentes contenidos de polifenoles como también diferentes niveles de capacidad antioxidante.

Según el análisis de conglomerados de la figura 13 referente a las muestras evaluadas podemos diferenciar 3 grupos, el primer grupo representa el 44,4 % y está conformado por las muestras de BChP, BLC, BPC y CC, el segundo

grupo representa el 33,3 % y está conformado por ChT, LC y PC y el tercer grupo representa el 22,2 % y lo conforman el PCh y GCh.



**Figura 13.** Presentación de análisis de conglomerados para alimentos preparados con licor y polvo de cacao.

El grupo 1 conformado en su mayoría por las bebidas de licor, polvo y chocolate para taza está más asociada a las antocianinas, además se tiene que estas muestras tienen una buena capacidad antioxidante, a respecto **WINKEL (2001)**, menciona que la cianidina-3-glucósido da el mayor poder radical lo que confiere la mayor capacidad antioxidante, de donde podemos encontrar la razón

de esta relación.

En el grupo 2 ligeramente separado del grupo 1 se observa una asociación cercana a las antocianinas y al contenido de polifenoles totales los cuales aportan en la capacidad antioxidante de las muestras inmiscuidos en este grupo, al respecto **CROZIER et al. (2011)** menciona que el polvo de cacao contiene concentraciones relativamente altas de ciertos compuestos polifenólicos, sobre todo flavanoles. Los flavanoles epicatequina, especialmente el monómero y oligómeros y polímeros de flavanoles llamados proantocianinas, pueden actuar como antioxidantes fuertes en los sistemas alimentarios.

**PEREA-VILLAMIL 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 actividad 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 actividad antioxidante 2,5 veces menor debido a que estos productos contienen aproximadamente un 30% de licor de cacao.

En el grupo 3 se observa a los muestras PCh y GCh los cuales fueron sometidos a temperaturas altas con la adición de un agente leudante, lo cual contribuye a una disminución de su capacidad antioxidante tal como lo indica, **HURTS et al. (2011)** quien menciona que las pérdidas de polifenoles ocurren durante el tostado, así como en el procesamiento de alcalinizado y al someter a horneado con agentes leudantes alcalinos. Además **STAHL et al. (2009)** menciona que en la preparación de pasteles y galletas el uso del agente leudante

tiende a elevar el pH del alimento superior a 7,5 lo cual genera la perdida de la capacidad antioxidante.

## V. CONCLUSIONES

- El mayor contenido de polifenoles totales se encontró en licor de cacao  $6,996 \pm 0,015$  mgEAG/100g y el menor galleta de chocolate  $0,339 \pm 0,008$  mgEAG/100g.
- El mayor contenido de antocianinas lo presentó el licor de cacao  $0,147$  mg cianidina-3-glucósido/g de muestra y el menor el pastel de chocolate  $0,009$  mg cianidina-3-glucósido/g muestra.
- La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH lo presentó el licor de cacao con  $IC_{50}$   $1,985$  mg/mL, disminuyendo en el siguiente orden: chocolate para taza, polvo de cacao, bebida de licor de cacao, bebida de polvo de cacao, bebida de chocolate para taza y polvo de cacao, cobertura chocolate, galleta chocolate y finalmente el pastel de chocolate con  $117,94$  mg/mL.
- La mayor capacidad antioxidante frente al radical ABTS<sup>o</sup> lo presentó el licor de cacao con  $IC_{50}$   $19,28$  mg/mL, disminuyendo en el siguiente orden: polvo de cacao, chocolate para taza, bebida de licor de cacao, cobertura chocolate, bebida de polvo de cacao, bebida de chocolate para taza y polvo de cacao, galleta chocolate y finalmente el pastel chocolate con  $IC_{50}$   $403,53$  mg/mL.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda consumir como alimentos preparados las bebidas a base de licor de cacao, chocolate para taza y polvo de cacao.
- Estudiar los polifenoles totales en productos horneados teniendo en cuenta el efecto del pH debido al uso del tipo de agente de fermentación a usar.
- Estudiar los polifenoles y la capacidad antioxidante en bebidas de chocolate aplicando distintos tipos de extracción ya que este influye en el contenido de polifenoles.
- Realizar estudios en coberturas de chocolate comerciales considerando el contenido graso, polifenoles y capacidad antioxidante.
- Evaluar las propiedades funcionales en chocolates comerciales.

## VII. ABSTRAC

### **“DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOLS, ANTHOCYANINS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN PREPARED FOODS WITH LIQUOR AND COCOA POWDER”**

This research was developed in the laboratories of CIPNA - CIDBAM and lab meat - UNAS. The objectives were: quantify total polyphenols, anthocyanins and determine the antioxidant capacity through the ability to inhibit free radical 1.1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis (3etilbenzotiazoline)-6-acidosulfonico acid in cake, cookie and beverage, prepared with liquor and cocoa powder. The solid samples were ground and defatted by the Folch method, hydroalcoholic extracts were prepared by weighing 2 g of sample in 20 mL (water / ethanol 50:50 v / v), macerated for 24 hours, filtered and centrifuged at 10000 rpm/10min/4°C, for liquid samples worked in their own state as aqueous extract. The results were analyzed by complete randomized design (DCA) in treatments with statistical difference Tukey test ( $p < 0.05$ ) was applied, using SAS version 9.0 software. Multivariate analysis and component principal was used to analyze the treatments jointly, using the Stat Info 2011 statistical software version. The highest total polyphenol contended found in cocoa liquor  $6,996 \pm 0,015$  mgEAG/100g and less chocolate chip cookie  $0.339 \pm 0.008$  mgEAG/100g, cocoa liquor presented it the largest in anthocyanins  $0,147$  mg cy-3-glu/g sample and less chocolate cake

0.009 mg cy-3-glu/g sample. The highest antioxidant capacity against DPPH radical was presented cocoa liquor and less chocolate cake IC<sub>50</sub> 117.94 and 1.985 mg / mL respectively. Similarly, the antioxidant capacity against ABTS ° + radical with IC<sub>50</sub> 19.28 mg / mL for liquor and IC<sub>50</sub> 403.53 mg / mL for chocolate cake.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGUILERA, O. 2009. Caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo (*Ficus 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.
- ADRIAZOLA, D. 2003. Producción de los alimentos de los dioses (*Theobroma cacao* L.). Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 5-8.
- ANDRES-LACUEVA, M., MONAGAS, N., KHAN, M., IZQUIERDO-PILIDO, M., URPI-SARDA, J., PERMANYER, and LAMUELA-REVENTÓS, R. 2008. Flavanol and flavonol contents of cocoa power products: influence of the manufacturing process. J. Agricultural and food chemistry. 56:3111-3117.
- ANDREW, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C. y STEIN, M. 1989. Plants metabolites, structure and im vitro antiviral activity of quinovic acid glycosydes from *Uncaria tomentosa* and *Gueterda playpoda*. Journal of natural products. 52: 679 – 685.
- 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.
- 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.

- BECKETT, S. 1994. Fabricación y utilización industrial del chocolate. Trad. Por Mariano Gonzalez. Zaragoza, España, Ed. Acribia S.A. 431p.
- BECKETT, S. 2002. La ciencia del chocolate. Trad por Antonio Vercet. Zaragoza, España, Ed. Acribia S.A. 201p.
- BELSCAK, A., DRAZENCA, K., HORZIC, D., KOVACEVIC, K., AND KARLOVIC, D. 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*. 42:707-716.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. WissTechnol*. 28: 25-30.
- BRAUDEAU, J. 1981. El Cacao Colección Agricultura Blume. Barcelona, España. 279 p.
- 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.
- CHAVEZ, R. 2012. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao. Tesis Ing. Ind. Alim. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 80p.
- CHAVEZ, R., y ORDOÑEZ, E. 2013. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento de licor y polvo de cacao. *R. ECI-Perú*. Perú. 10(1): 42-50.
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. 2001. Código Internacional recomendado

para condiciones generales para las fábricas y comercio de alimentos.

Capítulo 2. Art. 7 (Rev. 1995)

CODEX Alimentarius. 2010. FAO/AND WHO Standars. [en línea]:

([http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=es](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es))

consultada jueves 27 de Febrero 2014.

CODEX STAN 105 – 1981, Rev. 1-2001. norma para el cacao en polvo (cacao) y las mezclas secas de cacao y azúcares. [en línea]:

(<http://www.ipffsaph.org/cdsupload%5Ckopopdata%5Ccodex0%5Cescxs1415.pdf>, documento, 25 Ene. 2014).

CODEX STAN 87-1981, Rev. 3-1997. Norma para el chocolate y productos de chocolate. [en línea]:

(<http://www.ipffsaph.org/cdsupload%5Ckopopdata%5Ccodex0%5Cescxs1415.pdf>, documento, 25 Ene. 2014).

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, 25 Ene. 2014).

COOPER, A., CAMPOS-GIMENEZ, E., JIMENEZ, A., KORNEL, N., DONOVAN, L., and WILLIAMSON, G. 2007. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. J. Agric. Food Chem. 55(8):2841-2847.

- CONDEZO, C. O. 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. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 80p.
- CROZIER, J., PRESTON, G., HURTS, W., PAYME, J., JULIE, M., LARRY, H., and MILLER, L. 2011. Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. J. Chemistry Central. EEUU. 5:5
- CUBERO, E.; ENRÍQUEZ, G.; HERNÁNDEZ, A. y RODRIGUEZ, T. 1992. Calidad del cacao en cuatro zonas cacaoteras de Costa Rica. Turrialba. 42(3): 287-293.
- DESROSIER, N. 1985. Elementos de tecnología de alimentos. 3 ed. México, CECOSA. 783 p.
- FAO. 1992. Small-scale food processing: a guide for appropriate equipment. [en línea:] Consultado el 24 de septiembre, 2004.
- FOLASADE, F., FAGBEMI, N., CONFORT, F., y BADEJO, A. 2012. The antioxidant capacity of beverage blends made from cocoa, zobo and ginger. World Academy of Science, Engineering and Technology. EEUU. 69:588-592.
- GARCÍA, J.2011. La cultura del chocolate. Grup de Recerca en Metabolisme Energètic i Nutrició Dept. de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut. Universitat de les Illes Balears. [en línea]: (<http://www.um.es/lafem/Actividades/CursoBiologia/MaterialAyuda/2011-03-22-Paco.pdf>).
- GIANOLA, G. 1973. La industria moderna de galletas y pastelería. Madrid,

- España, Ed. PARANINFO – MAGALLANES. 271p.
- GONZALES, 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.
- HAMMERSTONE, J., LAZARUS, S., MICHELL, A., RUCKER, R., SCHMITZ, H. 1999. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 155: 490-496.
- HARDY, F. 1970. Manual del cacao. Ed. Turrialba. Costa Rica. 430 p.
- HERNÁNDEZ, E. 2010. Tecnología del cacao. Ingeniera de alimentos. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Colombia – Sogamoso. 170 p.
- HERNANDEZ, M. y PRIETO, G. 1999. Plantas que contiene polifenoles, Antioxidante dentro del estilo de vida. Centro de Investigaciones Biomédicas. *Revista Cubana de investigación Biomédica.* Cuba. 18: 1- 4.
- HICKS, J. TORRES, Y. SIERRA, V. 2006. Estrés oxidante, concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 14 (4): 223-226.
- 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. and HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* Helsinki, Finlandia. 47(10):3954-3962.

- HUANCA, M. J. 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. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria la Selva. 80p.
- INDECOPI. 1992. Galletas - Requisitos. Norma Nacional 206 - 001. Perú.
- INTITEC. 1981 Normas técnicas. N° 208.005, 208.006, 208.007. Lima Perú. 18p
- KOWALSKA, J. and SIDORCZUK, A. 2007. Analysis of the effect of technological processing on changes in antioxidant properties of cocoa processed products. J. Food Nutr. Scie. Polonia. 57, 2(A): 95 – 99.
- KRIS-ETHERTON, P., DERR, J., AND MITCHELL, D. 1993. The role of fatty acid saturation on plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins: I Effects of whole food diets high in cocoa butter, olive oil, soybean oil, dairy butter, and milk chocolate on the plasma lipids of young men. Metabolism. Jan 42: 121-129.
- 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. Food Chem. Seul, Coreadel Sur. 51 (25): 7292 – 7295.
- LEYVA, D. 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.
- LIENDO, R. 2005. Procesamiento del cacao para la fabricación de

chocolates y sub productos. Tecnología Post cosecha. INIA. Maracay. Food Res. 29: 279-307.

LÓPEZ, R., QUIÑONES, W., y ECHEVERRI, F. 2007. Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos. *Scientia et Technica*. 33(2): 275-276.

MADRID, V. 2001. Nuevo manual de Industrias Alimentarias. 3ra Edición Ed. Iragra S.A Madrid - España. 608p.

MALEYKI, A., AND ISMAIL, A. 2010. Antioxidant properties of cocoa powder. *Journal of Food Biochemistry*. 34(1): 111-128.

MARIANI, J. 1999. Encyclopedia of American Food and Drink. Nueva York: Lebhar-Friedman Books. 111p.

MARTÍNEZ, G. 2010. Procesos Básicos de Pastelería y Repostería. Ed. Akal. España. p. 15 – 17.

MILLER, K., STUART, A., SMITH, L., LEE, Y., McHALE, L., FLANAGAN, A., OU, B., and HURTS, W. 2006 Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J. Agric. Food Chem*. 54 (11): 4062-4068.

MONTES, S. 1985. Bromatología. 2 ed. Buenos Aires, Argentina, Universitaria. Volumen II. 609 p.

MURRAY, R. 1969. Estadística. Teoría y 875 problemas resueltos. Ed. McGraw – Hill de México. MEXICO. 241 p.

- NATZUME, M., OSAKABE, N., YAMAGUISHI, M., TAKISAWA, 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. *Biotechnol biochem. Japan* 64(12): 2581-2587.
- OLIVIERO, T., CAPUANO, E., CAMMERER, B., FOGLIANO, V. 2009. Influence roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model system. *J. Agric. Food Chem, Napoli, Italia.* 57(1):147-152.
- ORDOÑEZ, E., VARGAS, E., y LEON, A. 2012. Polifenoles totales, capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en chocolates comerciales para taza. Facultad Industrias alimentarias-UNAS Tingo María, Perú. Informe de investigación. 56p.
- OSAKABE, N., YAMAGISHI, M., SANBONGI, C., NATSUME, M., TAKIZAWA, T., OSAWA, T: 1998 The antioxidative substances in cacao liquor. *J Nutr Sci Vitaminol.* 44: 313-321.
- OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N., ADENAN, I. 2007 Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry.* 100:1523-1530.
- 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.
- 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.
- PEREA-VILLAMIL. J., CADENA-CALA, C., HERRERA-ARDILA, 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):128-134.
- POO, B. 2005. Concentración de Antocianinas en Jugo de Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante Nanofiltración. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Valdivia, Chile. 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. 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. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech j. Food Sci. Zagreb, Croacia*. 27 (5):330-337.
- RAMOS, C. 2007. Los carotenoides: el licopeno y su acción en el cáncer, *Toxicología alimentaria*, Lima, Perú, p 3 – 12.
- RODRIGUEZ, M. 2001. Bebidas enriquecidas con vitaminas y antioxidantes. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria. MEXICO*. 3(3): 123-126.

- RODRIGUEZ, P., D'AMICO, N., DE PASQUALE, R., y COSTA, G. 2001. Effects of *Vaccinium myrtillus* Anthocyanins on Triiodothyronine Transport in the Rat. *Pharmacol. Res.* 22 (Suppl. 3):59-60.
- ROSALES, L. 2003. Optimización del proceso de bioseparación de compuestos fenólicos a partir de dos variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz azul (*Zea mays* L.) y jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Informe de practica de especialidad. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM). Laboratorio de Biotecnología. Monterrey, México. 78p.
- SALINAS M, Y., ROJAS, H., SOSA, M., y PÉREZ, H. 2005. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *Agrociencia. Mexico.* 34(4): 385-394.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L. y MILLER, M. 2001. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidiummeyerii*). Publicación aceptada. *Food chemistry.* 1-23.
- SHAHIDI, F., AND WEERASINGHE, D. 2004. *Nutraceutical beverages.* Editorial American Chemical Society. Washington, D.C. Estados Unidos de America. 489p.
- 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 Food Science. EEUU.* 74(6):456-461.
- STRACK, D., y WRAY, V. 1994. The anthocyanins glycosides In: the flavonoides. *J*

- BHarbone (ed). Chapman Hall. London, UK. p: 1-22.
- SYDNEY, C. 1975 Dulces elaborados con azúcar y chocolate Ed. Acribia S. A. Zaragoza España. 29 p.
- TABERNERO, M., SERRANO, J., AND SAURA-CALIXTO, F. 2006. The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. J Food Science. EEUU. 41(1):28-32.
- UGARTONDO, C. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. España. 48 p.
- VALENZUELA, A., SANHUEZA, J., AND NIETO, S. 2003 Natural antioxidants in functional foods: From food safety to health benefits. Grasas Aceites; 54: 295-303.
- VARGAS, S., SOTO, H., y RODRIGUEZ, G. 2002. Preliminar analysis of anthocyanins of the cocoplum fruit (*Chrysobalanus icaco* L.) México. 25 (3): 261- 64
- VINSON, A., PROCH, J., AND ZUBIK, L. 1999. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. J. Agric. FoodChem. 47(12): 4821-4824.
- VINSON, A., YING, W., ETHERTON, D., JOHN, P., LAZARUS, A., y KRIS, M. 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. J Clinical Nutrition. EEUU. 74(5): 596-602.
- WAN, Y., VINSON, J., ETHERTON, T., PROCH, J., LAZARUS, S., KRIS-

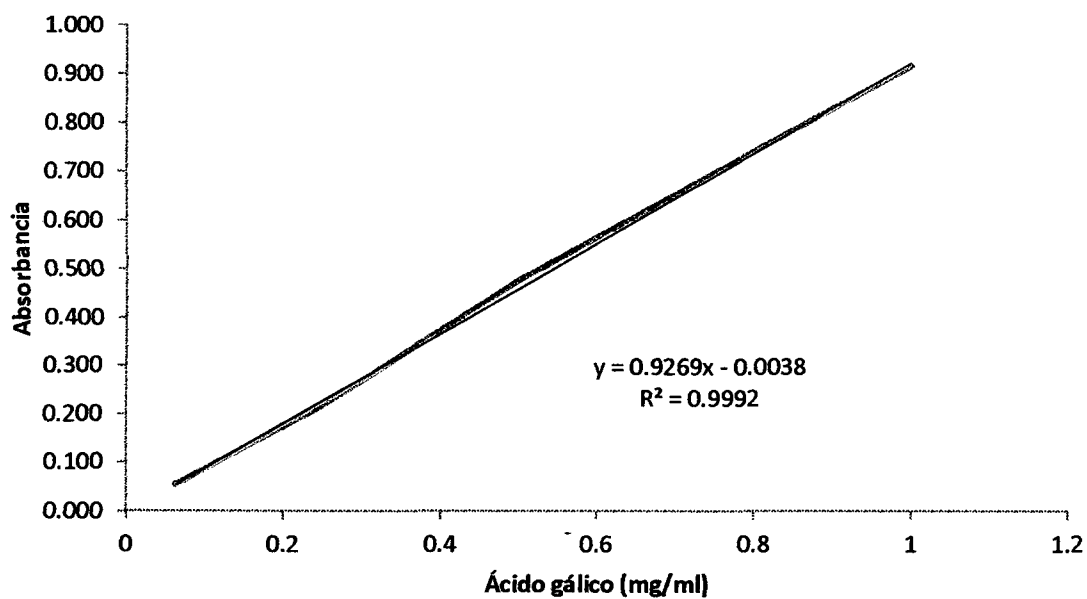
- ETHERTON, P. 2009 Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentration in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 74( 5 ): 596-602.
- WINKEL B., SHIRLEY. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plan Physiol.* 126: 485-493.
- WOLLGAST, J., AND ANKLAM, E. 2000 Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Res Int;* 33: 449-459.
- WOOD, G. 1982. *Cacao*. Ed. Continental. S.A. México. 363p.
- YU, S., DERR, J., ETHERTON, T., y KRIS-ETHERTON, P. 1995. Plasma cholesterol predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic. *Am J Clin Nutr .* 61: 1129-1139.
- ZHAO, J., WANG, J., CHEN, Y., AGARWAL, R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse aking two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'- gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* 20 (9): 1737-1745.
- ZUCCARELLI, T., WALDO, J., BERNARDETTE, H., Y SCHMIDT- HEBBEL, H. 1984. Estudio bromatológico de dos tipos de galletas con cobertura grasa. *Revista Chilena de Nutrición.* 1(23): 208-211.

**IX. ANEXO**

### A-I Concentraciones de ácido gálico para la curva estándar.

Repeticiones	Concentraciones (mg/ml)				
	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
1	0,927	0,509	0,241	0,117	0,049
2	0,912	0,456	0,184	0,106	0,049
3	0,911	0,467	0,233	0,108	0,065
<b>Promedio</b>	0,917	0,477	0,219	0,110	0,054

### A-II Curva patrón de Ácido gálico.



**A-III** Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra)

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	8	167,317	20,9146	54757,8	<0,0001
Error	18	0,006	0,0003		
TOTAL	26	167,323			
$R^2 = 0,9999$		CV = 0,7045	MSE = 0,0195	Media = 2,773	

**A-IV** Análisis de varianza cuantificación de antocianinas.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	8	0,08085133	0,01010642	1727,05	**
Error	18	0,00010533	0,00000585		
TOTAL	26	0,08095667			
$R^2 = 0,998699$		CV = 2,714656	MSE = 0,002419	Media = 0,089111	

**A-V** Análisis de varianza cuantificación de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) del radical DPPH

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	8	31538133,08	3942266,63	385807	**
Error	18	183,93	10,22		
TOTAL	26	31538317,00			
$R^2 = 0,9999$		CV = 0,457382	MSE = 3,196599	Media = 698,8904	

**A-VI** Análisis de varianza cuantificación de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) del radical ABTS<sup>o+</sup>

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	8	2365842,017	295730,252	1853850	**
Error	18	2,871	0,160		
TOTAL	26	2365844,888			
$R^2 = 0,9999$		CV = 0,162697	MSE = 0,399402	Media = 245,4889	

**A-VII. Análisis de componentes principales en los alimentos preparados con licor y polvo de cacao.**

Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Prop. Acumulada
1	3,27	0,82	0,82
2	0,55	0,14	0,95
3	0,18	0,05	1,00
4	3,5E-3	8,8E-4	1,00

Autovectores		
Variables	e <sup>1</sup>	e <sup>2</sup>
Polifenoles	-0,44	0,80
Antocianinas	-0,51	0,15
DPPH	0,52	0,46
ABTS	0,53	0,36

Correlaciones con las variables originales		
Variables	CP 1	CP 2
Polifenoles	-0,79	0,59
Antocianinas	-0,93	0,11
DPPH	0,93	0,34
ABTS	0,96	0,27