

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**Departamento Académico de Ciencia, Tecnología e Ingeniería de
Alimentos**



**"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

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTADO POR:

JOSÉ ANTONIO HUANCA MELGAREJO

Tingo María - Perú

2010



Q04

H83

Huanca Melgarejo, José A.

Polifenoles Totales, Catequina y Actividad Antioxidante en Granos de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Criollo y CCN-51 en las Etapas de Beneficio y Tostado.
Tingo María, 2010

71 h.; 11 cuadros; 17 fgrs.; 70 ref.; 30 cm.

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

THEOBROMA CACAO L. / POLIFENOLES TOTALES / CATEQUINA /

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE / METODO-TOSTADO / METODOLOGIA/

TINGO MARIA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUANUCO / PERU.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

Tingo María

FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Av. Universitaria s/n. Teléfono (062) 561385 – Fax (062) 561156

Apart. Postal 156 Tingo María E.mail: fia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 30 de Setiembre de 2010, a horas 4:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bach. **HUANCA MELGAREJO, José Antonio**, titulada:

“POLIFENOLES TOTALES, CATEQUINA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CRIOLLO Y CCN-51 EN LAS ETAPAS DE BENEFICIO Y TOSTADO”

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. 22º de la Ley Universitaria 23733; los artículos 51º y 52º del Estatuto Actualizado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 11 de Noviembre de 2010

.....
Ing. Eduardo A. Cáceres Almenara
Presidente

.....
Ing. Jaime E. Basilio Atencio
Miembro

.....
Ing. Jhony W. Vargas Solórzano
Miembro

.....
Dra. Elizabeth S. Ordóñez Gómez
Asesora

DEDICATORIA

A **DIOS**, por brindarme la vida y
su inmenso amor.

A mis padres:

**Nicéforo Huanca y Saturnina
Melgarejo** con eterna gratitud por
su amor y haberme inculcado el
espíritu de superación.

A **Lito Ángel Huanca** con
carifio

A mis hermanos con mucho
aprecio:

**Elmer, María, Porfirio, Elizabeth,
Ever, Edgar, Presilda, Eva y Elva.**

A mis sobrinos:

**Elkin, Erick, Williams, Elvis,
Yeltsin, Katherine, Evelyn,
Ever, Galindo, Frank,** y a la
memoria de mi sobrino **Jesús.**

A mis tíos:

**Juana, Claudia, Pablo, Antonio,
Crisóstomo, Salina** y a la memoria
de mi tía **Martina.**

A mis primos:

**Abner, Luís, Luz, Patricia,
Rosmeri, Jhenny y Juan.**

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por permitir forjarme como profesional.
- A la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias a sus trabajadores y a los profesores que me brindaron sus conocimientos dentro, como fuera de las aulas durante mi formación profesional.
- A la Cooperativa Industrial Naranjillo Ltda, por todo el apoyo en facilitarme las muestras de cacao y el acceso al centro de beneficio (Villacop).
- A la Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez, mi asesora, por sus orientaciones y dedicación desplegada hasta concluir el presente trabajo.
- Al Dr. Manuel Sandoval Chacón, por su confianza y compartir su filosofía de hacer investigación.
- Al Ing. Davy Hidalgo Chávez, Asistente de investigación del CIPNA, por su apoyo incondicional en las arduas horas de trabajo dentro del laboratorio.
- Al personal del laboratorio de la Universidad Nacional Agraria de la Selva por las facilidades brindadas para la ejecución del presente trabajo de investigación.
- A mis amigos. Merli, Sissy, Nátaly, Jackeline, John, Víctor, Heber, Marco, Obed, Oscar, Justo, Elías, Edward, Luis, Félix, Manuel, Evil, Patricia, Helens, Guadalupe y Lenard por su compañerismo y amistad.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos generales del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	3
2.1.1. Origen y distribución geográfica del cacao.....	3
2.1.2. Clasificación taxonómica.....	4
2.1.3. Descripción botánica.....	4
2.1.4. Clasificación botánica.....	6
2.1.5. Composición química y valor nutricional del cacao.....	10
2.2. Beneficio del cacao.....	10
2.2.1. Cosecha.....	11
2.2.2. Quiebra.....	11
2.2.3. Fermentación.....	12
2.2.4. Secado.....	12
2.2.5. Almacenamiento.....	13
2.3. Tostado de cacao.....	13
2.4. Generalidades de antioxidantes.....	14
2.4.1. Definición.....	14
2.4.2. Principales antioxidantes.....	15
2.4.3. Polifenoles.....	15
2.4.4. Efectos benéficos de los antioxidantes.....	18

2.5. Radicales libres.....	18
2.5.1. Formación de radicales libres.....	19
2.5.2. Importancia de los radicales libres	20
2.6. Extracto y métodos de extracción	21
2.7. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Lugar de ejecución.....	24
3.2. Materia prima	24
3.3. Equipos materiales y reactivos	26
3.3.1. Equipos de laboratorio	26
3.3.2. Materiales.....	26
3.3.3. Reactivos y solventes.....	27
3.4. Métodos de análisis	28
3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	28
3.4.2. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	28
3.4.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.....	28
3.5. Metodología experimental.....	29
3.5.1. Preparación de extractos.	29
3.5.2. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	32

3.5.3. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	34
3.5.4. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.....	36
IV. RESULTADOS	41
4.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	41
4.2. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.....	42
4.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	43
4.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC ₅₀) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH).....	43
4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC ₅₀) radical peroxilo	44
V. DISCUSIÓN	46
5.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN- 51 en las etapas de beneficio y tostado	46
5.2. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	49
5.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado	52

5.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH)	52
5.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical peroxilo	56
VI. CONCLUSIONES.....	59
VII. RECOMENDACIONES	60
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición de las almendras (porcentaje peso en fresco)	10
2. Importancia biológica de radicales los libres.....	20
3. Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación.....	21
4. Preparación de soluciones de trabajo de cacao Criollo y CCN-51.	37
5. Preparación de soluciones de trabajo de cacao Criollo y CCN-51.	40
6. Cuantificación de polifenoles totales cacao Criollo y CCN-51.	42
7. Cuantificación de catequina cacao Criollo y CCN-51.	43
8. Resultados del IC ₅₀ del radical DPPH de cacao Criollo y CCN-51.	44
9. Resultados del IC ₅₀ del radical peroxilo de cacao Criollo y CCN-51.....	45
10. Determinación de la curva estándar de ácido gálico.	77
11. Determinación de la curva estándar de Catequina por HPLC.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sistema HPLC en gradiente de baja presión	23
2. Flujograma para la obtención de materia prima (cacao Criollo y CCN-51).	25
3. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.	31
4. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto acuoso de cacao.	32
5. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.	34
6. Diseño experimental para la cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.	35
7. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en cacao Criollo y CCN-51 con DPPH°	38
8. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante de cacao Criollo y CCN-51 con peroxilo.	40
9. Representación del contenido de polifenoles totales en cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.	42
10. Representación del contenido de catequina en cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.	43

11. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en granos de cacao en las etapas de beneficio y tostado.....	44
12. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical peroxilo en granos de cacao en las etapas de beneficio y tostado.....	45
13. Representación de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.....	76
14. Cromatograma de la curva estándar de catequina (Cat) determinada por HPLC.....	77
15. Representación de la curva estándar para la cuantificación de catequina.....	78
16. Cromatograma de catequina en cacao Criollo en las etapas de beneficio y tostado determinada por HPLC.....	79
17. Cromatograma de catequina en cacao CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado determinada por HPLC.....	80

RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo originario del bosque húmedo tropical usado en la industria chocolatera y productos cosméticos, se indica que tiene propiedades antioxidantes. El objetivo fue cuantificar polifenoles totales, catequinas y evaluar la actividad antioxidante de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado. Las muestras fueron granos de cacao en estado fresco (sin fermentar, secado en estufa 35°C/8 horas y 65°C/18 horas), fermentado (Criollo 5 días y CCN-51 6 días, secado en estufa 35°C/8 horas y 65°C/16 horas), seco (secado solar/6días) y tostado (120°C/30min). Todas las muestras fueron molidas y desengrasadas por el método Folch. Los extractos para la cuantificación de polifenoles totales y la evaluación de la actividad antioxidante (DPPH y peroxilo) se hicieron extractos hidroalcohólicos (agua/etanol 50:50v/v) que consistió en pesar 2 g cacao/20 mL, macerado/24 horas, filtrado y centrifugado a 10000 rpm/10min/4 °C. Para la cuantificación de catequina el extracto consistió en pesar 1g de cacao/100mL hervido 1 hora, filtrado, centrifugado a 10000 rpm/10min/4 °C y microfiltrado. El análisis estadístico se realizó mediante el DCA con arreglo factorial de 2x4 y la prueba de Tukey ($p < 0,05$) y se utilizó el software SAS 6,0. El mayor y menor contenido de polifenoles totales fue $9,209 \pm 0,034$ g EAG/100g cacao CCN-51 fresco y $7,332 \pm 0,035$ g EAG/100g cacao CCN-51tostado. El mayor contenido de catequina correspondió al cacao CCN-51 fresco $5077,770 \pm 3,601$ mg Cat. /Kg y el menor contenido fue para el Criollo tostado $545,336 \pm 15,957$ mg Cat. /Kg y la mayor capacidad de inhibición del radical DPPH fue $IC_{50} = 38,754 \pm 0,52$ µg/mL cacao CCN-51fresco, la mejor capacidad de inhibir el radical peroxilo fue $IC_{50} = 7,248 \pm 0,09$ µg/mL cacao CCN-51fresco.

I. INTRODUCCIÓN

En la amazonía peruana el cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos que tiene buena producción especialmente en el Valle del Alto Huallaga, por las condiciones medio ambientales apropiadas, además éste siendo uno de los cultivos agrícolas más importantes en el país por su alta calidad, lo convierte en un producto muy cotizado en el mercado mundial.

Las poblaciones de cacao Criollo y CCN-51, son los que se vienen cultivando en esta zona, el primero por ser un cacao fino de alta calidad y muy cotizado en el mercado internacional; y el cacao CCN-51, por su alto rendimiento en grano, manteca y su adaptabilidad al medio para su cultivo.

Sin embargo, para la obtención del cacao es relevante el beneficio, ya que ello conlleva a modificaciones bioquímicas, que generan los precursores de sabor característico a chocolate, de igual manera en el tostado se da las reacciones no enzimáticas que complementan éstos compuestos. Los alimentos de origen vegetal ejercen un efecto protector contra algunas enfermedades como el cáncer, trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares. Esta propiedad se debe a presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como los polifenoles, siendo las catequinas uno de los fenoles con capacidad anti radical muy acentuada, estos provienen de metabolitos secundarios de las plantas que protegen del daño por agentes oxidantes, como los rayos

ultravioleta, contaminación ambiental y otras sustancias. Estos compuestos en los procesos tecnológicos a la que son sometidos los alimentos sufren degradaciones considerables, de allí el interés despertado para realizar la investigación en cacao de dos poblaciones en las etapas de beneficio y tostado; para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- Cuantificación de polifenoles totales y catequinas en los granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.
- Evaluar la actividad antioxidante del cacao Criollo y CCN-51, por su capacidad de inhibir radicales libres 1,1-difenil-2-picrylhidrazil (DPPH) y peróxido en las etapas de beneficio y tostado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

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

2.1.1. Origen y distribución geográfica del cacao

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

WOOD (1982) menciona que el cacao (*Theobroma cacao L*), es una de las 22 especies que constituyen el género *Theobroma*. La misma que es nativo del nuevo mundo y la especie se extiende en América del sur, de México hasta Brasil y Bolivia. Su centro de origen está en la cuenca del Amazonas y el Orinoco.

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

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

En esta región se ha encontrado los más diversos tipos de frutos, algunos parecidos al criollo, denominados “Criollos de montaña”, amelonados grandes como el “Nacional” del Ecuador, “Angoletas” parecidos a los clones “Parinaris” y otros tipos de “Amelonados” (SORIA, 1987).

2.1.2. Clasificación taxonómica

El cacao obedece a la siguiente clasificación taxonómica (LEÓN, 1968).

División	:	Fanerógamas.
Clase	:	Angiospermas.
Subclase	:	Dicotiledónea.
Orden	:	Málvales.
Familia	:	Sterculiáceae.
Género	:	Theobroma.
Sección	:	Eutheobroma.
Especie	:	<i>Theobroma cacao</i> L.

2.1.3. Descripción botánica

El árbol de cacao, es un árbol pequeño, entre 4 y 8 metros de alto, puede alcanzar hasta los 10 metros de alto siendo ésta condicionada por la sombra de árboles grandes. El tallo es recto, la madera de color claro, casi blanco y la corteza es delgada, de color café (BRAUDEAU, 1981).

2.1.3.1. Tallo

El brote inicial es ortotrópico, con las hojas pecioladas, insertadas según el índice filotáxico de 3/8. Después de un año y con una altura de 1,50 m, se interrumpe el crecimiento apical y surgen 5 yemas laterales que formaran ramas plagitrópicas dorsiventrales (horquetas) las que se diferencian del brote ortotrópico por las hojas pecioladas (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2000).

2.1.3.2. Hojas

Tienen dimorfismo acentuado, correlacionado con el brote ortotrópico y la rama plagiotrópica. En el cacao las hojas nuevas, poseen una coloración que varía de rojo vino verde a blanco de acuerdo a la cantidad de antioamina de que está provista; las hojas adultas poseen una coloración verde, son glabras, variando de obovada-oblonga a lanceolada, acuminadas con bordes liso y nervación penninervia (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2000).

2.1.3.3. Flores

La flor de cacao es pedicelada, hermafrodita con 5 sépalos, 5 pétalos, 5 estaminoides y un ovario pentacarpelar supero. Los sépalos son carnosos con una coloración que varía de rosada a blanca. Los 5 estambres son bifurcados en el ápice, poseyendo cada bifurcación una antera biteca de dehiscencia ramosa; cada estambre está envuelto por la concha petaloidea del pétalo y se alterna con estaminoide filiforme y erecto. En la base, los estaminodios se unen en los filamentos formando un tubo (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2000).

2.1.3.4. Fruto

Presenta variación taxonómica; el polimorfismo del fruto es muy discutible, a pesar de que es imprescindible para una caracterización de variedades y tipos cultivados. Botánicamente el fruto es una sub baya glabra, variando su tamaño de 10 a 32 cm.; algunas veces liso, otras corrugado de forma amelonada y hasta fusiforme; el color varía cuando el fruto está en desarrollo de verde hacia amarillo; el grosor de la cáscara es también variable, estando el epicarpio y el endocarpio carnosos separados por una camada fina y leñosa del mesocarpio, (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2000).

2.1.3.5. Semilla

También las semillas son polimorfas; varían de elipsoide y ovoides a amigdaloides, de sección arredondeada e irregularmente comprimida. En la semilla hay dos integumentos envueltos por células poliédricas mucilaginosas, provenientes del integumento externo que, a la maduración, tiene color blanco y sabor ácido azucarado. La testa es subcoriacea; el embrión está formado por dos cotiledones fuertemente corrugados, de color que varía entre violeta oscuro y blanco; posee una sección circular y una plúmula poco desarrollada. El endospermo en la maduración se presenta como una lamina entre los cotiledones (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2000).

2.1.4. Clasificación botánica

Cheesman (1944), citado por WOOD (1982) reconoció la dificultad de aplicar el término de variedad a la clasificación del cacao y prefirió hablar

de poblaciones que pueden o no presentar intergraduaciones, pero al mismo tiempo tienen características por las que pueden distinguirse entre sí. Este autor sugiere la clasificación siguiente:

2.1.4.1. Cacao criollo

Corresponde a una planta de poco vigor y bajo rendimiento, destacándose la alta calidad de sus semillas; mazorca de color rojo a verde antes de la madurez, de forma generalmente alargada con una punta muy acentuada en el extremo inferior, marcados con diez surcos muy profundos iguales o a veces repartidos en dos grupos alternos de cinco, uno de los dos menos acentuados; pericarpio en general muy rugoso, delgado y fácil de cortar, el mesocarpio delgado y poco lignificado; granos gruesos de sección casi redonda, con los cotiledones frescos de color blanco o muy ligeramente pigmentados. Considerado comercialmente como cacao fino, con quiebra de color, muy aromático, con ligero amargor, usado en la chocolatería de lujo, menos vigoroso, más sensible a las enfermedades que los híbridos (BRAUDEAU, 1981).

2.1.4.2. Cacao forastero

WOOD (1982) manifiesta que el cacao forastero se caracteriza por ser de mayor tolerancia a las enfermedades que el cacao Criollo. Representa aproximadamente un 95 % de la producción mundial, proveniente de los países de África Occidental y Brasil.

Pertenece a todos los cacaos corrientes del Brasil y del oeste

africano, así como el cacao nacional de Ecuador y numerosos países de América Central, América del Sur en donde se encontró estos cultivares, parecen ser originarios de la alta amazonía y están dispersados por la cuenca del Amazonas, las características destacables son: estaminodios pigmentados de violeta; mazorca de color verde (amarillo en la madurez) de morfología variable que abarca desde la forma de Criollo hasta amelonado (poco o nada asurcado, superficie lisa, extremidades redondeadas o embotadas); pericarpio espeso y difícil de cortar a causa de la presencia de un mesocarpio fuertemente lignificado; granos más o menos aplastados con los cotiledones frescos de color púrpura subido (BRAUDEAU, 1981).

2.1.4.3. Cacao trinitario

Pertenecen a poblaciones híbridas, resultado del cruzamiento natural del tipo Criollo y Forastero, presentan una gran heterogeneidad. Aunque originalmente se aplicó a la población de Trinidad, ahora abarca algunos de los cacaos de países tales como Sri Lanka, Indonesia y Papua-Nueva Guinea, en donde las introducciones de Criollo se han cruzado con introducciones posteriores de forastero (WOOD, 1982).

2.1.4.4. Cacao CCN-51

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

Es una variedad ecuatoriana que crece en la zona tropical del país, es conocida como clon de alta calidad, y de excelente productividad y tolerancia a enfermedades como la escoba de bruja y *ceratoystis fimbriata*. En 1960, en la hacienda Theobroma localidad de Guayas, a 70 kilómetros al sudeste de Guayaquil, Homero Castro un investigador agrónomo, desarrolló el clon de cacao CCN-51, luego de efectuar muchos experimentos logró una doble hibridación basada en la colección de varios materiales genéticos de cacao trinitarios y cacao forasteros amazónicos (CRESPO y CRESPO, 1997).

El cultivo de cacao CCN-51, necesita clima caliente y húmedo con temperatura promedio anual 23 a 26°C, precipitación anual entre 1500 a 2500 mm con un mínimo mensual entre 100 a 120 mm. Así mismo es muy importante tener en cuenta que cuando la temperatura baja a menos de 22°C casi no hay floración, mientras que entre los promedios superiores a 25°C la formación de flores es abundante lo cual significa también abundancia de mazorcas. La mazorca del CCN51 tarda aproximadamente 140 días en madurar en los meses calurosos, mientras que en los meses más frescos se demoran en hacerlo aproximadamente 160 días. Este estado se reconoce por el cambio de color que se observa en la superficie; pues el CCN-51 del color rojo se torna a un amarillo anaranjado fuerte. Cuando existen dudas sobre un fruto maduro, basta golpearlo con los nudos de los dedos de la mano y si se produce un sonido hueco el fruto está maduro (CRESPO y CRESPO, 1997).

La variedad CCN51 tiene buen rendimiento y resistencia a las enfermedades fungoideas comunes, haciéndole una alternativa aceptable. El clon también puede competir en los mercados exigentes en lo que se refiere a calidad;

con un manejo pos cosecha y una buena fermentación el cacao CCN-51 alcanza rendimientos sobre 4000 kg de grano seco/Ha (ESPINOZA *et al.*, 2006).

2.1.5. Composición química y valor nutricional del cacao

La composición y el valor nutricional del cacao varían de acuerdo a la variedad y otros factores (suelo, condiciones climáticas y labores culturales)

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

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

Fuente: SULLCA, 1992.

2.2. Beneficio del cacao

El beneficio del cacao es una secuencia de actividades que se inicia en la cosecha con la finalidad de obtener granos de calidad superior, una

humedad máxima de 8 %, libre de impurezas, buen aroma y buena presentación (ARÉVALO, 2004).

2.2.1. Cosecha

La cosecha es el proceso de recolección de frutos o mazorcas consideradas fisiológica, organolépticamente maduras y sanas; la madurez de la mazorca se aprecia por el cambio de la pigmentación de verde a amarillo o amarillo anaranjado a rojo violáceo, frutos no cosechados a tiempo se sobre maduran y germinan los granos (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 2004). El cacao alcanza una madurez total aproximadamente a los 6 meses después de la época de floración (ARÉVALO, 2004).

HERNANDEZ (1991) manifiesta que debe obviarse en la recolección frutos sobre maduros, debido a que las almendras pueden estar podridos o germinados; frutos verdes o pintones, éstas presentan una acidez alta en el mucílago y las almendras son de menor tamaño.

2.2.2. Quiebra

La quiebra es la segunda etapa del beneficio de cacao que consiste en partir los frutos y extraer los granos; debe realizarse antes de los 5 días después de la cosecha (ARÉVALO, 2004).

ACEBY y RODRIGUEZ (2002) mencionan que la quiebra de las mazorcas se debe realizar con un machete sin filo y tener cuidado de no causar daño a las almendras.

2.2.3. Fermentación

ARÉVALO (2004) menciona que la fermentación comprende la eliminación de baba del cacao y dentro del grano la formación de sustancias que le dan sabor y aroma a chocolate, consiguiendo calidad del grano y facilitando el secado. GAITÁN (2005) indica que durante la fermentación la temperatura en la masa de almendras puede subir hasta 50°C; cuando la temperatura llega a 45°C, los embriones de la semilla mueren, en ese momento inicia los cambios bioquímicos que luego darán el sabor y aroma a chocolate. Las transformaciones bioquímicas, que ocurren tanto en la parte interior como en el exterior de los granos, como consecuencia de la presencia o ausencia de oxígeno, ocurre la fermentación aeróbica y anaeróbica a través de las levaduras y bacterias, produciéndose fermentación alcohólica, acética, láctica y butírica, siendo las dos últimas las no deseadas en el proceso de fermentación del cacao (ACEBY y RODRIGUEZ, 2002).

VELLOSO (1985) manifiesta que durante los primeros días de fermentación la masa emite olores semejantes al alcohol, luego al tercero o cuarto día pasa a un olor como vinagre (agrio), pudiendo permanecer hasta el final de la fermentación.

2.2.4. Secado

El secado del cacao tiene por finalidad eliminar el exceso de agua y conservar el sabor y aroma a chocolate adquirido en el proceso de fermentación. Los granos recién fermentados tienen más de 50 % de humedad, que debe reducirse por lo menos a 7 – 8 %, límite considerado como crítico para el

almacenamiento evitando que se desarrollen hongos (mohos) que afectan la calidad del grano (ARÉVALO, 2004).

ICT (2003) menciona que el secado puede ser solar o artificial, siendo el método más aconsejable el secado al sol; ya sea en eras de cemento o sobre mantas de polipropileno; se recomienda realizar ésta labor sobre parihuelas de madera, bambú o cañabrava que reposan sobre travesaños levantados del suelo para evitar la evaporación de la humedad del suelo y la contaminación con tierra y otros agentes extraños que disminuyen la calidad del grano.

2.2.5. Almacenamiento

Los granos de cacao secos, se guardan en sacos de yute y almacenan en ambientes techados de blanco o de colores claros y secos, bien ventilados acomodados y apilados sobre parihuelas de madera alejada de productos que emanen olores fuertes (servicios higiénicos, pesticidas, combustibles, detergentes, humo) (ICT, 2003).

2.3. Tostado de cacao

El tostado es un tratamiento térmico fundamental en el procesamiento del chocolate y sus condiciones dependen de factores como: variedad del cacao, tratamientos previos al tostado y humedad (LOPEZ *et al.*, 2003).

QUEIROZ (1999) manifiesta que las reacciones que ocurren, durante el tostado dependen de factores como tiempo de tostado, temperatura,

contenido de agua, pH, así mismo son afectadas la concentración de compuestos precursores aromáticos.

Fadini (1998), citado por LÓPEZ *et al.* (2003) menciona que el tostado de cacao en forma de nibs, a temperatura de 150°C durante 38 minutos, es considerado ideal para la formación máximo de sabor y aroma de chocolate.

2.4. Generalidades de antioxidantes

2.4.1. Definición

Es considerado como antioxidante a toda sustancia que hallándose a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (HALLIWELL *et al.*, 1987).

Un antioxidante puede ser definido como una sustancia que en pequeñas cantidades pueden retardar o inhibir la acción de un pro-oxidante (oxidante) en una reacción de oxidación (SIES, 1997 y WEISBURGER, 1999).

Los antioxidantes inhiben la propagación de radicales libres por eso son utilizados para prevenir el deterioro de los alimentos, evitando la rancidez de las grasas y los cambios de color. Los antioxidantes se clasifican en antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos (SIES, 1997).

Todo antioxidante prolonga la vida útil de los alimentos protegiéndolo contra el deterioro causado por la oxidación (PSZCZOLA, 2001)

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

Los procesos de antioxidación incluyen: inhibición de radicales para prevenir su propagación, hidrólisis enzimática de enlaces ésteres para remover ácidos grasos peroxidados de lípidos, quelamiento de iones metálicos de transición, reducción de peróxidos por catálisis enzimática (THOMAS, 2000).

2.4.2. Principales antioxidantes

2.4.2.1. Antioxidantes endógenos

Los antioxidantes endógenos o antioxidantes enzimáticos actúan a nivel intracelular. Existen tres sistemas principales de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CTL) y glutatión peroxidasa (GPX) (GONZÁLES-TORRES *et al.*, 2000).

2.4.2.2. Antioxidantes exógenos

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

Los extractos naturales están constituidos por diversos compuestos de naturaleza química diferente como polifenoles, isoprenoides, compuestos tiólicos, ácido ascórbico y polisacáridos que en conjunto contribuyen, bajo diferentes mecanismos ejercer la actividad antioxidante (GORMAZ, 2005).

2.4.3. Polifenoles

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 *et al.*, 1999).

2.4.3.1. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos. Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos.

De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (MARTINEZ-FLORES *et al.*, 2002).

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

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6 - C_3 - C_6$), compuesto por dos anillos de fenil (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (BORS *et al.*, 1990).

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

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

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

2.4.3.2. Catequina

Las catequinas son los principales constituyentes de varios tipos de té son mejores por su efecto antioxidativo, antimutación, anticarcinogénica, antibiótica y hipertensión. Las principales flavan 3 - oles presentes en el té

constituyen una mezcla de catequinas (CAT) entre ellas: epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) y epicatequina (EC) (MELCHOR, 2002).

ZÚÑIGA (2005) manifiesta que los oligómeros o polímeros de la (+) catequina y (-) epicatequina abundan en las semillas y hollejos, aunque pueden encontrarse en las hojas y raíces.

2.4.4. Efectos benéficos de los antioxidantes

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

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

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

2.5. Radicales libres

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

Los radicales libres son moléculas que en su estructura atómica presenta uno ó más electrones desapareados o impares en el orbital externo y puede existir independientemente (CLARCKSON y THOMPSON, 2000).

REILLY y BULKEY (1990) menciona que los radicales libres son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados; son químicamente inestables, altamente reactivos y pueden causar lesiones severas a los tejidos vivos, debido a su habilidad para generar perturbadoras reacciones químicas en cadena, en su intento por recobrar la estabilidad de los electrones.

El desbalance entre la producción de Especies Reactivas de Oxígeno Reactivo (EROS) y la defensa antioxidante, provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). El estrés oxidativo está asociada a: 1) Enfermedades inflamatorias: artritis, vasculitis; 2) Enfermedades del corazón; 3) Ischemia intestinal, síndrome de inmunodeficiencia adquirida; 4) Úlceras gástricas; 5) Enfermedades de alzhéimer; 6) Parkinson y muchas otras (ANDREOLI, 2000).

2.5.1. Formación de radicales libres

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

Los sistemas biológicos producen radicales libres mediante diversas reacciones, procesos oxidativas normales dentro de las células. Fuentes exógenas incluyen a los efectos de la radiación ionizante sobre las moléculas orgánicas y a la degradación térmica de la materia orgánica (como la combustión de tabaco) (DIPLOCK, 1991).

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

Cuadro 2. Importancia biológica de radicales los libres.

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

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

Fuente: REILLY y BULKEY, 1990.

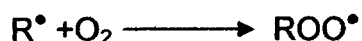
2.5.2. Importancia de los radicales libres

Una gran variedad de procesos metabólicos derivan de la producción de radicales libres y compuestos reactivos de oxígeno.

2.5.2.1. Radical peroxilo ROO^\bullet

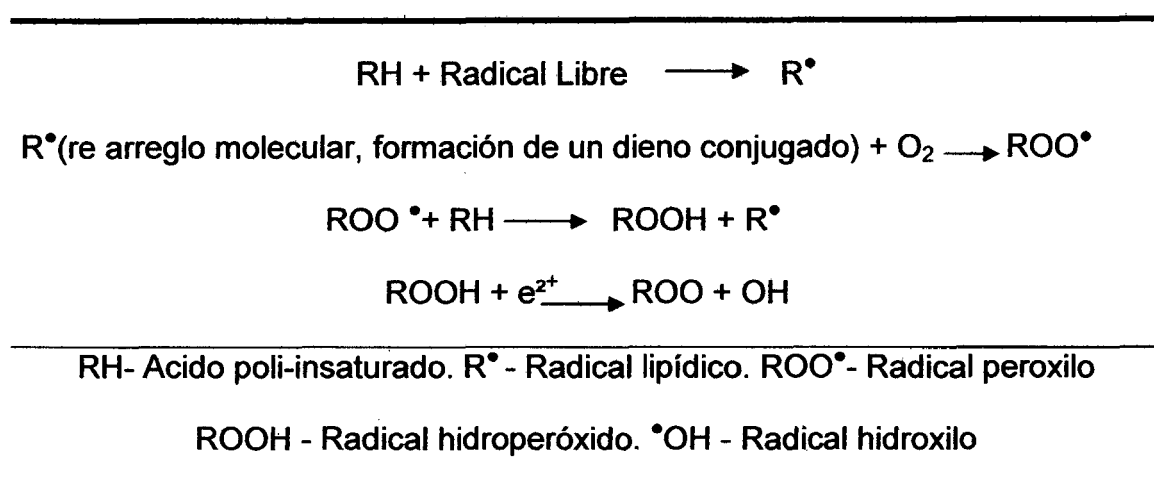
Son radicales más abundantes en los sistemas biológicos. Se originan a partir de la adicción de oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonatado. Se forman como intermediarios durante la ruptura de los lípidos peroxidados en las reacciones de la peroxidación lipídica. La formación de ROO^\bullet es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la peroxidación lipídica; tal como se presenta en el Cuadro 3. La peroxidación lipídica de la membrana produce alteraciones de las funciones secretoras y de los gradientes iónicos. Numerosos residuo químicos de esta

reacción puede difundir del sitio donde se producen y provocar edema, estimular fosfolipasa A₂, inducir la liberación de ácido araquidónico con la consiguiente formación de eicosanoides.



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

Cuadro 3. Cadena de reacciones en el proceso de lipoperoxidación.



Fuente: GONZALES -TORRES *et al.* 2000.

2.6. Extracto y métodos de extracción

El extracto es la separación de componentes en una mezcla de líquidos por contacto con disolvente adecuado inmisible en ella, se usa para extraer determinados componentes relevantes presentes en vegetales (LEWIS e IRVING, 1992; MAZZA, 1998).

Según MAZZA (1998) la extracción de componentes activos de las plantas, se ven influenciadas por muchos factores: como la preparación de la muestra, el procedimiento de extracción y el disolvente usado. Se puede extraer con: éter, metanol y agua.

Los extractos hidroalcohólicos contienen mayor concentración de compuestos fenólicos, con porcentaje de taninos condensados de 13 a 16%, esto indica que poseen una considerable proporción de flavonoides que les dan buen potencial para ser considerados como antioxidantes (ROSALES y GONZÁLES, 2003).

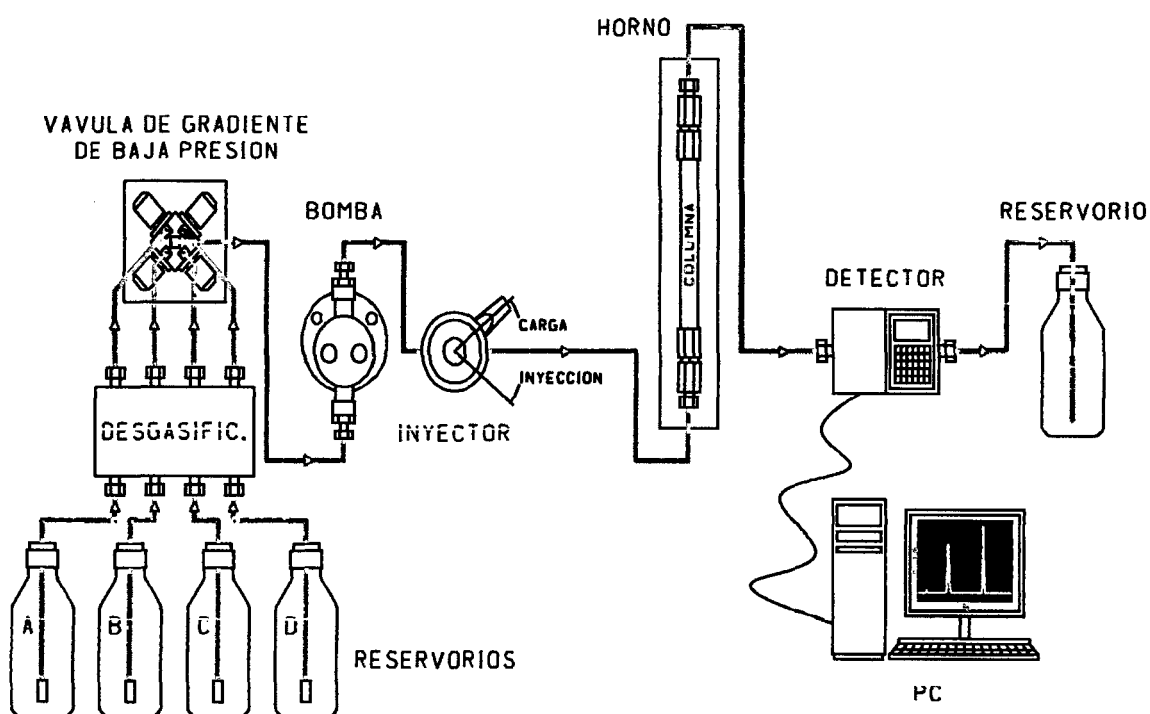
2.7. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

La cromatografía líquida de alta performance (HPLC) es una técnica analítica de separación de compuestos, que permite aislar, identificar y cuantificar los compuestos desconocidos tales como vitaminas, proteínas y compuestos activos como flavonoides, alcaloides y esteroides en una muestra o solución conocida. Para la cuantificación de estos compuestos se utiliza estándares específicos (HORIE y KOHATA, 2000). La técnica HPLC describe el proceso en donde la fase móvil (líquido) es mecánicamente bombeado a través de una columna que contiene la fase estacionaria (sólido) y la cuantificación de los analitos se realiza mediante un detector (NIELSEN, 1998).

Bomba; son dispositivos de alta tecnología que tiene por función de entregar la fase móvil a través del sistema, a un flujo variado (1mL/min.) en cantidades exactas y de manera precisa.

Columna; la columna es considerada como una herramienta para la separación de las moléculas presentes en la muestra que está siendo analizado.

Detector; el detector por lo general es ultravioleta (UV) o visibles (VIS), es el instrumento que detecta la presencia de moléculas motivo de análisis. Una vez que la muestra sale de la columna es presentada al detector que identifica en función a la absorbancia la cantidad presente de un determinado analito; luego el detector convierte esta interacción en señal electrónica que es enviada al sistema de datos. La magnitud de esta señal es graficada contra el tiempo, para generar un gráfico llamado cromatograma (NIELSEN, 1998).



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

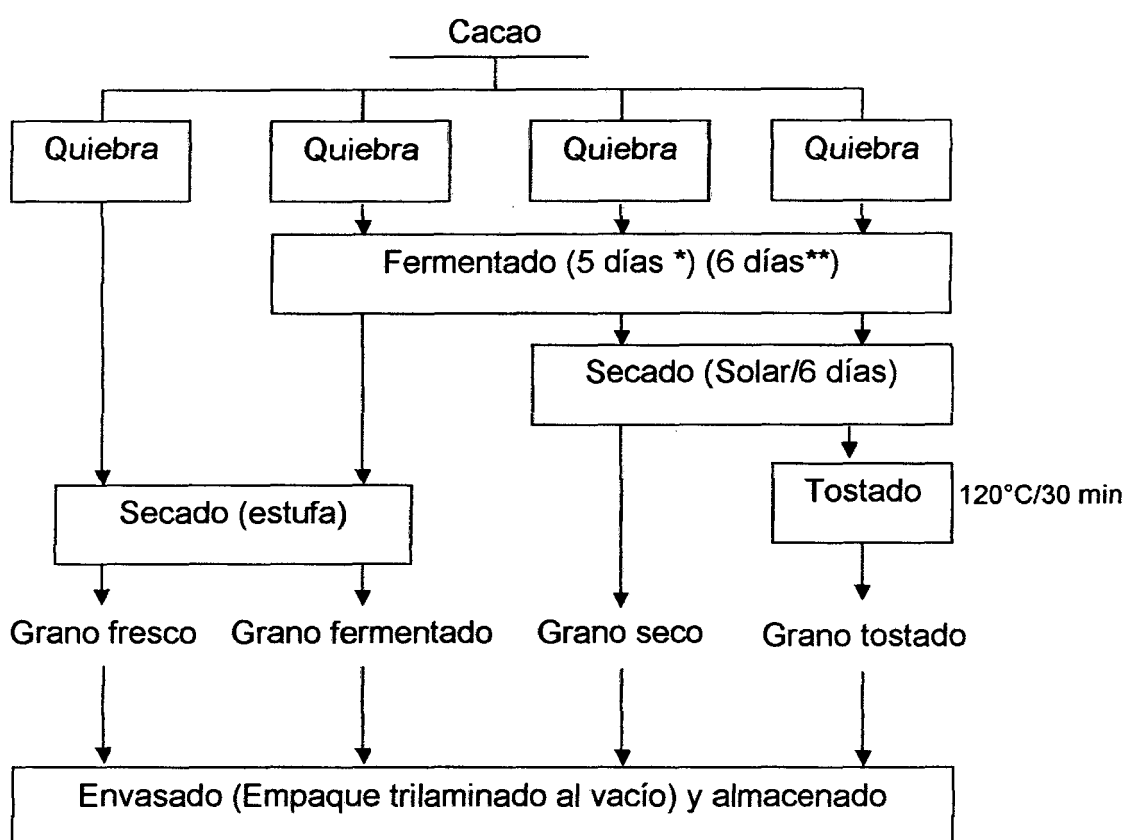
El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Centro de investigación de Productos Naturales de la Amazonía (CIPNA) y Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en el distrito de Rupa Rupa, 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

La materia prima de cacao Criollo y CCN-51 fueron obtenidos del centro de beneficio Villacop de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo LTDA, cuya procedencia fue de las parcelas del sector "La Cadena" del Distrito de Padre Felipe Luyando Provincia de Leoncio Prado Departamento de Huánuco, la misma que se muestreó en las diferentes etapas del beneficio (fresco, fermentado, secado) de manera aleatoria. Las muestras frescas y fermentadas fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio y secadas gradualmente en estufa a 35°C /8 horas y 65°C /18 horas para la muestra

fresca, la muestra fermentada a 35°C /8 horas y 65°C /16 horas, hasta una humedad del 7 %.

La muestra de cacao seco se obtuvo después del fermentado y el secado se realizó mediante un secador solar hasta 7 % de humedad. La muestra de grano tostado se realizó a partir del grano seco, la misma que fue tostado a 120°C/30 min. Todas las muestras fueron envasadas en empaques trilaminadas y almacenadas hasta su análisis.



Donde: (5 días*), tiempo de fermentado de cacao Criollo.

(6 días**), tiempo de fermentado de cacao CCN-51.

Figura 2. Flujograma para la obtención de materia prima (cacao Criollo y CCN-51).

3.3. Equipos materiales y reactivos

3.3.1. Equipos de laboratorio

- Equipo de HPLC (Shimadzu Scientific, MD, USA.).
- Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation).
- Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión).
- Estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven)
- Congelador FFV-2065FW (Frigidaire, USA)
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead)
- Agitador magnético modelo 625 standard (VWR™ hotplate/stirrer)
- Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industries SI™)
- Baño maría modelo YCW-010E (Associated With Cannic, Inc, USA).
- Refrigeradora Icebeam Door Cooling LG GR-5392QLC.

3.3.2. Materiales

3.3.2.1. Materiales de vidrio

- Matraces erlenmeyer de 150, 250 mL.
- Vasos de precipitación de 50, 80, 100, 250 y 1000 mL.
- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Micropipetas 10 – 50 μ L, 10 – 100 μ L, 20 – 200 μ L y 100 – 1000 μ L.
- Tubos de ensayo Gene Mate® de 10 mL.
- Fiolas de 10, 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 mL.

3.3.2.2. Otros materiales

- Cubetas de poliestireno, Gene Mate[®] (1cmx 1cmx4.5cm).
- Tips, FISHERBRAND[®] (1000 y 200 μ L).
- Microtubos (1,5 -2,00 mL)
- Filtro de membrana de 0,2 μ m
- Pinzas.
- Espátulas.
- Gradillas.

3.3.3. Reactivos y solventes

- Ácido gálico al 98,1 % Sigma Aldrich.
- (+) Catequina: pureza 98 %. Sigma Chemical.co
- 1,1-Diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS; Sigma Aldrich, USA).
- 2,2-azobis (2-amidino-propane) (ABAP; Sigma Aldrich, USA)
- Fosfato de potasio dihidrogenado (Scharlau, UE).
- Etanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Metanol (grado HPLC), Sigma Chemical
- Etanol al 99,99 % Merck KGaA.
- Folin-ciocalteu's phenol reagent, 2N, Sigma Aldrich.
- Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) p.a. ISO. Scharlau.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) en lentejas p.a. ISO. Merck. Germany.
- Agua destilada desionizada ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$).

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

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

3.4.2. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

La cuantificación de catequina se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC) reportado por DING *et al.* (1999) la misma que fue detectada a 270 nm. La fase móvil utilizada consistió en una solución de agua, metanol y ácido acético a 70: 30: 0,1 (v/v). La separación por HPLC se efectuó con 100 % de la fase móvil a (0 - 15 min) a una velocidad de separación (flujo) de 1 mL/min; volumen de inyección para los estándares y las muestras fueron de 20 µL respectivamente.

3.4.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

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

Se realizó por el método espectrofotométrico de luz visible a 517 nm descrito por Brand *et al.* (1995) reportado por SANDOVAL *et al.* (2001) que se fundamenta en usar el reactivo 1,1 -diphenyl-2 -picrylhidrazil (DPPH) como indicador para medir la capacidad de secuestro de compuestos con propiedades

antioxidantes presentes en la muestra. El principio del método DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (compuestos fenólicos) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazine y una especie radical.

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

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

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Preparación de extractos.

Las operaciones realizadas para la preparación de los extractos hidroalcohólico y acuoso se indican en la Figura 3 y 4 respectivamente y se describen a continuación.

3.5.1.1. Descascarillado

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

3.5.1.2. Molido

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

3.5.1.3. Desengrasado

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

3.5.1.4. Envasado

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

3.5.1.5. Almacenado

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

3.5.1.6. Extracto hidroalcohólico

Para la cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao, consistió en pesar 2g de muestra desengrasada y se maceró por 24 horas en 20 mL de solución hidroalcohólico (50:50 v/v), con agitación manual cada 30 minutos las 2 primeras horas, luego se dejó en reposo hasta completar el tiempo restante.

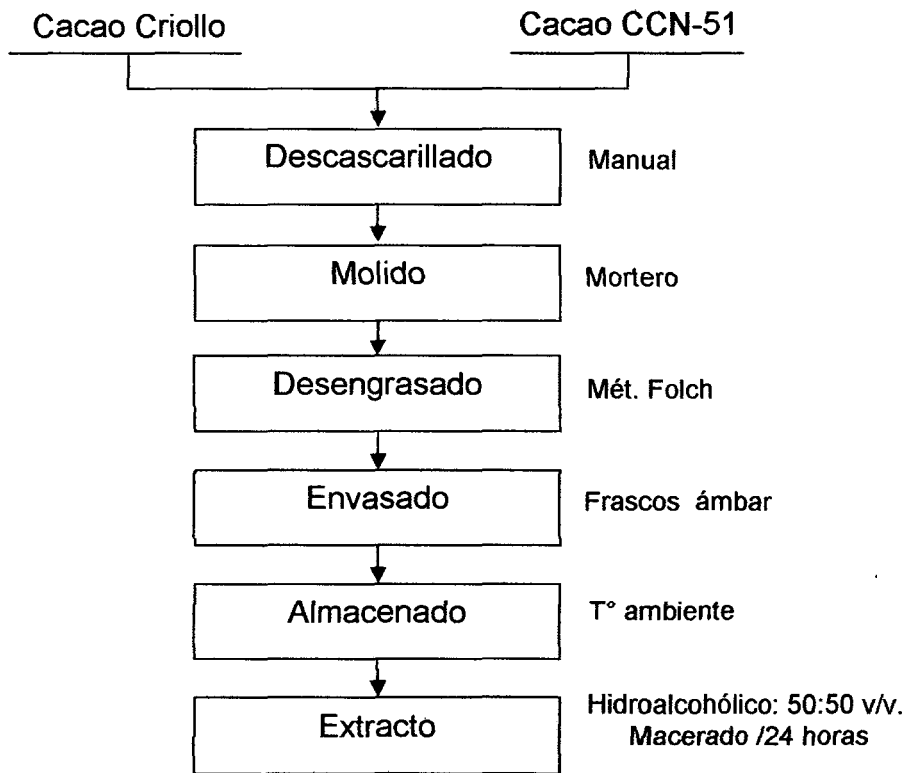


Figura 3. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.

3.5.1.7. Extracto acuoso

Para la cuantificación de catequina se preparó extracto acuoso que consistió en pesar 1g de muestra de cacao desengrasada y hervido en 100 mL de agua desionizada por 1 hora, con agitación manual cada 10 minutos; luego fue enraizado a 100 mL.

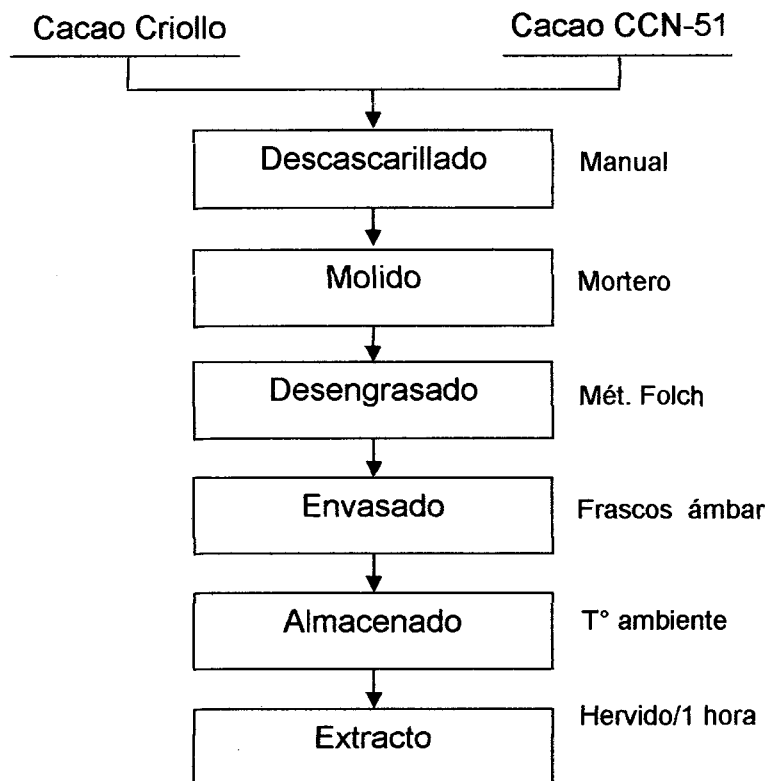


Figura 4. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto acuoso de cacao.

3.5.2. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

3.5.2.1. Determinación de la curva estándar

La curva estándar se realizó preparando una solución stock de 10 mL de ácido gálico a una concentración de 2 mg/mL a partir de ello se hicieron las concentraciones siguientes: 0,03125; 0,0625 0,125; 0,25; 0,50 y 1,00 mg/mL, cada dilución se preparó por triplicado. Se agregó a cada tubo 1,58 mL de agua desionizada y 20 μ L de muestra, control y estándares, se homogenizó ligeramente. Luego se agregó 100 μ L de solución de fenol Folin-Ciocalteu a

cada muestra, control y estándares, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizó la reacción agregando 300 μL de Na_2CO_3 al 20 % y finalmente se incubó 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.

3.5.2.2. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51

La cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/ mL (filtrado y centrifugado 10 000 rpm/10min a 4°C), a partir de ello se realizó la dilución de trabajo 6 mg/mL, con 5 repeticiones por tratamiento. Cabe destacar que se adicionó en los tubos para cada tratamiento 1580 μL de agua destilada, 20 μL de extracto diluido (6 mg/mL), 100 μL de fenol folin ciocalteu y finalmente 300 μL Na_2CO_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 (g EAG/100g muestra).

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial 2*4 en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se procedió a determinar la prueba de Tukey $p < 0,05$.

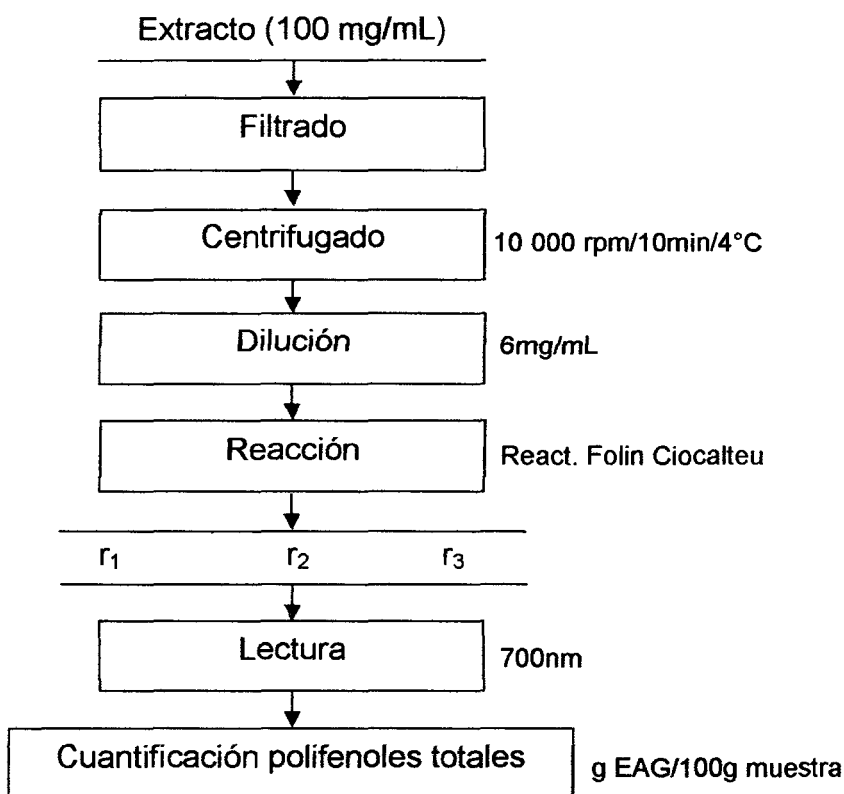


Figura 5. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

3.5.3. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

3.5.3.1. Determinación de la curva estándar

La curva estándar para la cuantificación de catequina se realizó con catequina, se preparó una solución stock de catequina a 1000 $\mu\text{g/mL}$, a partir de ésta se prepararon las siguientes concentraciones: 1, 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{g/mL}$, luego se inyectó un volumen de 20 μL por concentración, la lectura se hizo en el HPLC a una longitud de onda de 270 nm. Se usó el software Class-VP del sistema HPLC para obtener la ecuación generada por la curva estándar de catequina.

3.5.3.2. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51

La cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado se realizaron del extracto acuoso 10 mg/ mL (filtrado, centrifugado 10 000 rpm/10 min a 4°C), se separó el sobrenadante y se microfiltró (0,2 µm), siendo ésta la concentración con la que se trabajó, la misma que se hizo por triplicado para cada tratamiento. Luego se inyectó 20 µL del extracto la lectura se hizo por HPLC a 270 nm. Las aéreas obtenidos fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en (mg Catequina/Kg muestra). Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2*4, en los tratamientos donde existió diferencia estadística se realizó la prueba de Tukey $p < 0,05$.

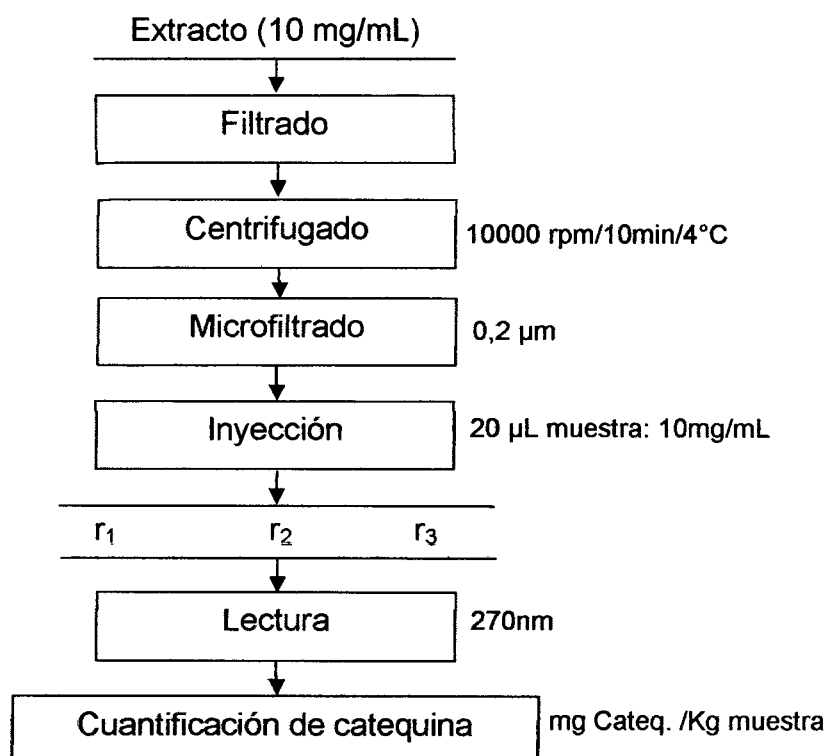


Figura 6. Diseño experimental para la cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

3.5.4. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

Para la evaluación de la actividad antioxidante se realizó usando radicales libres (DPPH y peroxilo) quienes simulan reacciones en un ente biológico.

3.5.4.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH) en granos de cacao Criollo y CCN-51

Para la determinación del coeficiente de inhibición del radical DPPH se siguió el método descrito en el ítem de métodos de análisis. Para ello se preparó 10 mL de solución stock de DPPH a 1mM en metanol al 99 % de pureza, se agitó hasta la solubilización completa del compuesto y se almacenó a 4°C protegido de la luz.

A partir de ésta solución stock se preparó 50 mL de DPPH a 20 μ M en metanol al 99 % de pureza. Para la inhibición del radical DPPH con granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (filtrado y centrifugado 10 000 rpm/10min a 4°C). A partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 30, 60, 90 y 120 μ g/mL. En el Cuadro 4 se describe el modo de operación que se siguió.

Cuadro 4. Preparación de soluciones de trabajo de cacao Criollo y CCN-51.

Solución de trabajo (µg/mL)	Solución stock 100 mg/mL (µL)	Agua destilada (µL)	Volumen final (µL)
30	12	988	1000
60	24	976	1000
90	36	964	1000
120	48	952	1000

A una cubeta de poliestireno se adicionó 25 µL de la solución intermedia y 975 µL de solución DPPH a 100 µM, se realizó la lectura en un espectrofotometro de UV/VIS a una longitud de onda de 517 nm con un tiempo de 10 min e intervalos de tiempo de 30 segundos. Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[\frac{\text{Abs control} - \text{Asb muestra}}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

Donde: Abs Control: Absorbancia del control

Abs Muestra: Absorbancia de la muestra en 10 min.

Los resultados de la capacidad de inhibir (IC₅₀) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2*4 y en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey p <0,05.

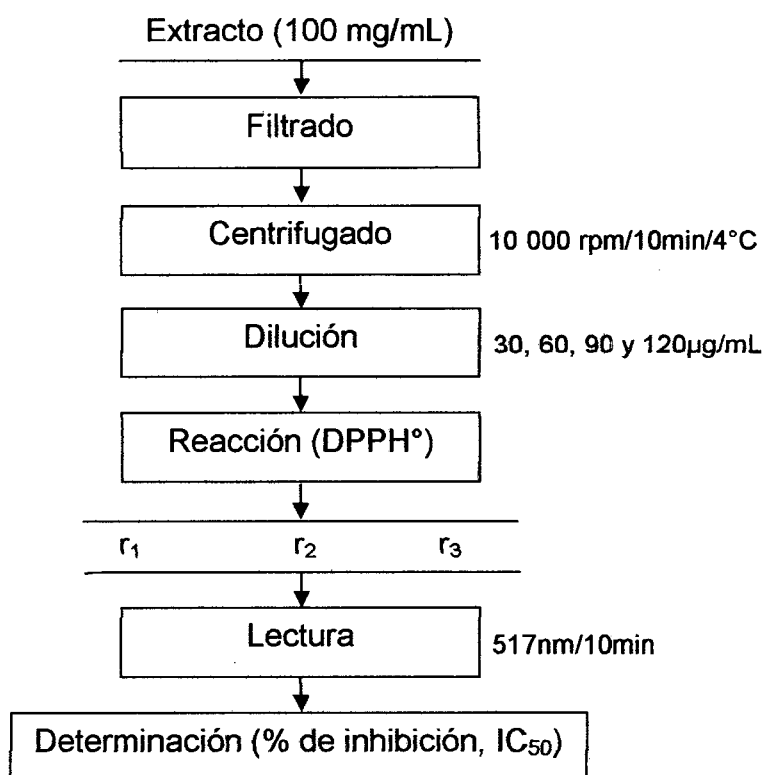


Figura 7. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en cacao Criollo y CCN-51 con DPPH°.

3.5.4.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical peroxilo en granos de cacao Criollo y CCN-51

Se evaluó mediante el método de TRAP (poder total de actividad reductora) reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2001). Para ello se prepararon las siguientes soluciones stock en agua destilada desionizada (H_2O dd); 100 mL de ABTS a 2,25 mM y 100 mL ABAP a 20 mM, y 1 Litro de solución buffer fosfato a pH 7,4 (PBS) con cloruro de sodio (NaCl) a 154 mM, fosfato de sodio heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) a 2,7 mM y fosfato de potasio (KH_2PO_4) a 1,5 mM. La preparación de radical peroxilo consistió en mezclar 10 mL de solución de ABTS, 10 mL ABAP y 80 mL de PBS (pH 7,4), se incubó a 70°C en baño

maría por 16 minutos y se dejó enfriar sobre hielo durante 30 minutos. Para la inhibición del radical peroxilo en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (filtrado y centrifugado 10 000 rpm/10min a 4°C), a partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 3, 6, 12 y 24 µg/mL. En el Cuadro 5 se detalla las operaciones para la preparación de la solución de trabajo.

Cuadro 5. Preparación de soluciones de trabajo de cacao Criollo y CCN-51.

Solución de trabajo (µg/mL)	Solución stock 100mg/mL (µL)	Agua destilada (µL)	Volumen final (µL)
3	3	997	1000
6	6	994	1000
12	12	988	1000
24	24	976	1000

A una cubeta de poliestireno se adicionó 10 µL de la solución de trabajo y 990 µL de solución peroxilo, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 414 nm con un tiempo de 10 min e intervalos de tiempo de 30 segundos. Para la determinación del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición Peroxilo} = \left[\frac{\text{Abs control} - \text{Asb muestra}}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

Donde: Abs Control: Absorbancia del control

Abs Muestra: Absorbancia de la muestra en 10 min.

Los resultados de la capacidad de inhibición (IC_{50}) del radical peroxilo se determinó en cada uno de los tratamientos, el cual nos indica la cantidad de extracto hidroalcoholico de cacao ($\mu\text{g}/\text{mL}$) necesarios para inhibir el 50 % del radical peroxilo, la misma que se analizó mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2×4 . Para los niveles donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey $p < 0,05$

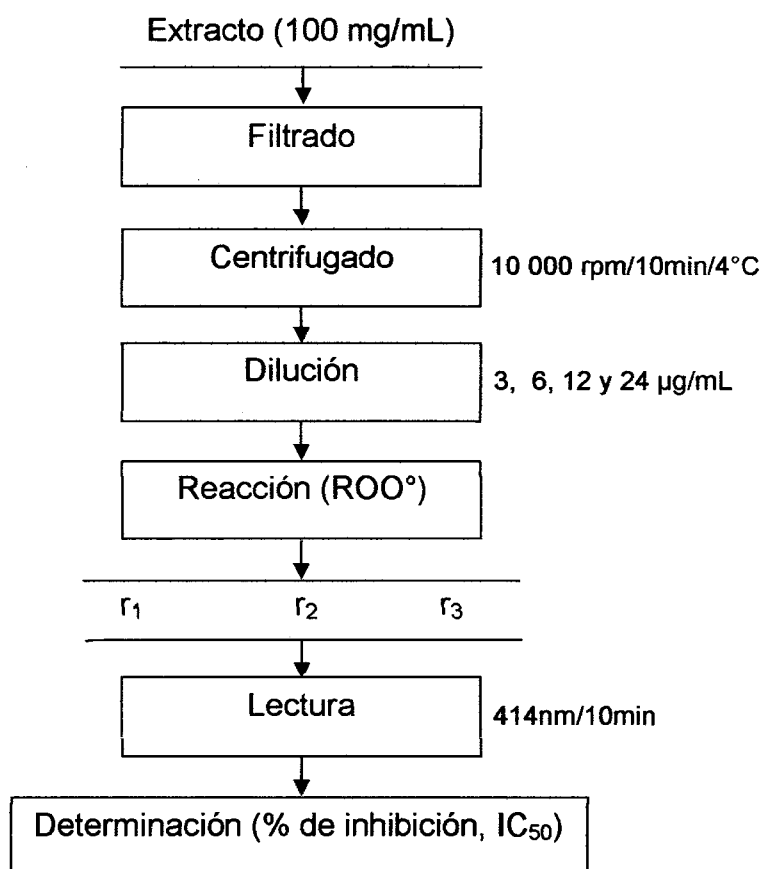


Figura 8. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante de cacao Criollo y CCN-51 con peroxilo.

IV. RESULTADOS

4.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

La cuantificación de polifenoles totales en los granos de cacao Criollo y CCN-51 se presenta en el Cuadro 6 y Figura 9, los resultados fueron expresados en equivalente de ácido gálico (EAG).

Cuadro 6. Cuantificación de polifenoles totales cacao Criollo y CCN-51.

Etapas B/T	Cacao Criollo (g EAG/100g)	Cacao CCN-51 (g EAG/100g)
Fresco	7,951±0,037 ^a	9,209±0,034 ^a
Fermentado	7,742±0,012 ^b	7,799±0,015 ^b
Seco	7,597±0,011 ^c	7,547±0,038 ^c
Tostado	7,441±0,045 ^d	7,332±0,035 ^d

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

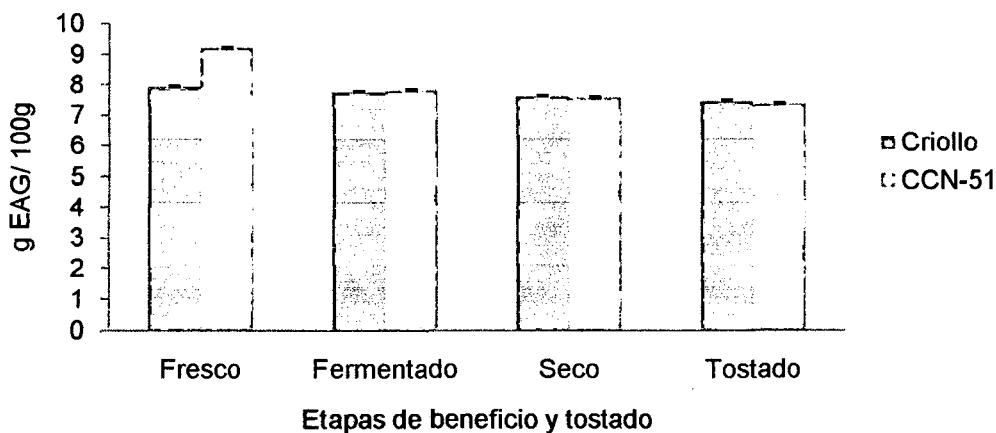


Figura 9. Representación del contenido de polifenoles totales en cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

4.2. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

La cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN51 se presenta en el Cuadro 7 y Figura 10.

Cuadro 7. Cuantificación de catequina cacao Criollo y CCN-51.

Etapas B/T	Cacao Criollo (mg Cat. /Kg)	Cacao CCN-51 (mg Cat. /Kg)
Fresco	4407,830 ±11,611 ^a	5077,770±3,601 ^a
Fermentado	978,096±2,054 ^b	938,267±15,183 ^b
Seco	664,183±7,699 ^c	812,756±17,462 ^c
Tostado	545,336±15,957 ^d	654,046±1,849 ^d

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

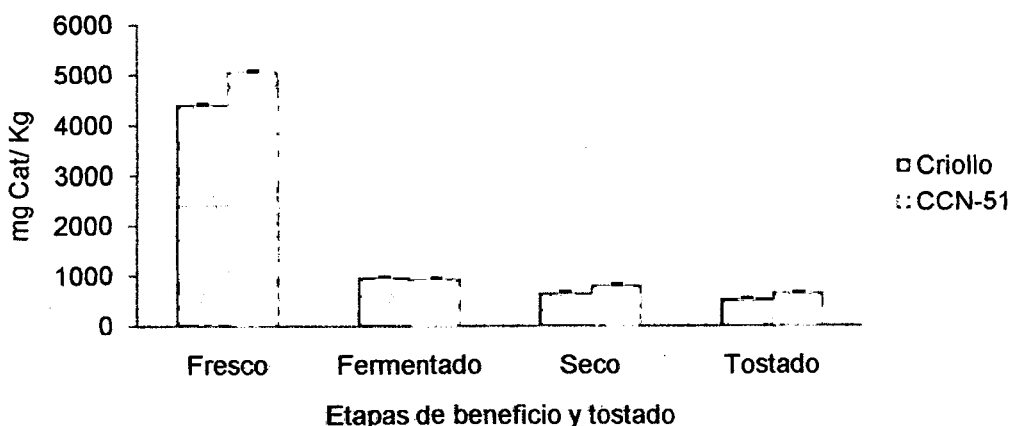


Figura 10. Representación del contenido de catequina en cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

4.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

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

La comparación de los resultados del coeficiente de inhibición del radical DPPH en los granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado se presenta en el Cuadro 8 y Figura 11.

Cuadro 8. Resultados del IC_{50} del radical DPPH de cacao Criollo y CCN-51.

Etapas B/T	Cacao Criollo IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cacao CCN-51 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Fresco	52,846 \pm 0,38 ^a	38,754 \pm 0,52 ^c
Fermentado	41,500 \pm 0,52 ^d	49,977 \pm 0,56 ^b
Seco	43,041 \pm 0,16 ^c	52,493 \pm 0,29 ^a
Tostado	47,437 \pm 0,37 ^b	52,716 \pm 0,46 ^a

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

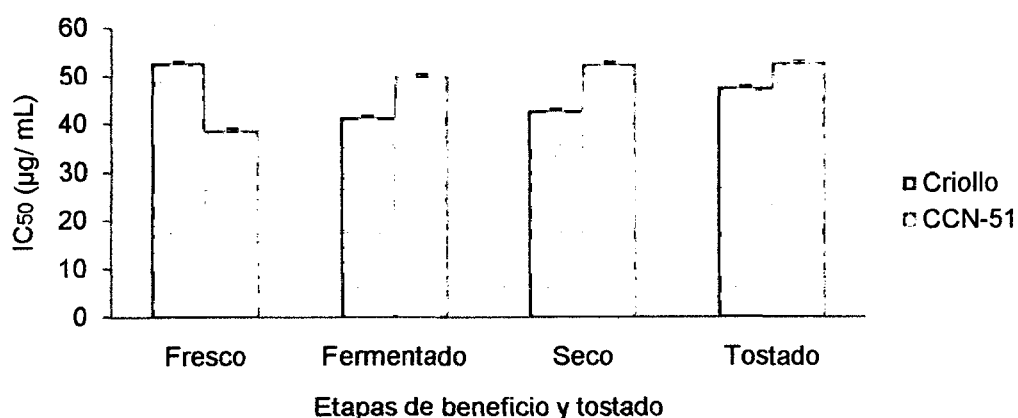


Figura 11. Comportamiento del IC₅₀ con el radical DPPH en granos de cacao en las etapas de beneficio y tostado.

4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC₅₀) radical peroxilo

Los resultados del coeficiente de inhibición del radical peroxilo en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las diferentes etapas de proceso se presentan en el Cuadro 9 y Figura 12.

Cuadro 9. Resultados del IC₅₀ del radical peroxilo de cacao Criollo y CCN-51

Etapas B/T	Cacao Criollo IC ₅₀ (µg/mL)	Cacao CCN-51 IC ₅₀ (µg/mL)
Fresco	8,934±0,09 ^d	7,248±0,09 ^d
Fermentado	9,827±0,05 ^c	8,093±0,07 ^c
Seco	11,014±0,06 ^a	9,146±0,08 ^b
Tostado	10,719±0,03 ^b	9,767±0,07 ^a

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

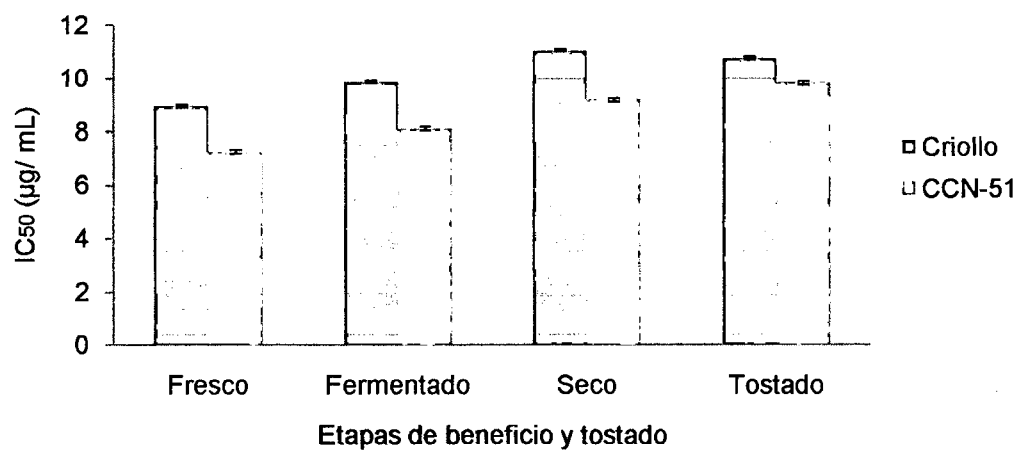


Figura 12. Comportamiento del IC₅₀ con el radical peroxilo en granos de cacao en las etapas de beneficio y tostado.

V. DISCUSIÓN

5.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao Criollo y CCN- 51 en las etapas de beneficio y tostado

Recientemente el efecto de los polifenoles en alimentos y su función biológica ha sido difundido especialmente en cacao porque es una fuente rica en polifenoles. Así mismo, estos polifenoles son considerados en el cacao como los responsables para explicar el mecanismo de su efecto antioxidante.

Los resultados de la cuantificación de polifenoles en los granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado presentan diferencia estadística altamente significativa (A - Ia).

En el Cuadro 6 y Figura 9 se presenta los resultados del grano de cacao Criollo en las etapas de beneficio y tostado se observa que existe diferencia estadística altamente significativa (A-Ib), comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) se encontró que el mayor contenido de polifenoles correspondió a granos de cacao fresco $7,911 \pm 0,037$ g EAG/100g.

Con respecto a esto TOMAS-BARBERAN *et al.* (2007) manifiesta que el contenido de polifenoles totales en granos de cacao no fermentados y secados de diferentes países es variable, Costa de Marfil variedad Forastero $8,15 \pm 1,82$ g EAG/100g, Colombia variedad Amazon $8,14 \pm 0,37$ g EAG/100g,

Ecuador variedad Amazon, Trinitario, Canelo y Amazon híbrido $8,42 \pm 0,87$ g EAG/100g, Venezuela variedad Trinitario $6,43 \pm 0,56$ g EAG/100g, y Perú variedad Criollo 5 g EAG/100g, comparando estos resultados con los datos de la investigación el contenido de polifenoles se encuentra dentro del rango.

El contenido de polifenoles en granos de cacao fermentado fue de $7,742 \pm 0,012$ g EAG/100g esto puede ser explicado por LOPEZ *et al.* (2003) reporta que durante la fermentación sucede la oxidación de las antocianinas y complejos de aminoácidos con compuestos fenólicos formando quinonas, estas contribuyen disminuyendo el amargor y astringencia de las almendras. Asimismo ARLORIO *et al.* (2008) indica que los polifenoles en granos de cacao fermentado disminuye porque éstas se difunden en los fluidos celulares, desde las células almacenadas y sufren oxidación por la condensación de moléculas de taninos, por reacciones enzimáticas catalizadas por la polifenol oxidasa y en el mismo proceso se inactiva éstas rápidamente.

El contenido de polifenoles en granos de cacao tostado fue menor $7,441 \pm 0,045$ g EAG/100g comparado al grano seco $7,597 \pm 0,011$ g EAG/100g; este comportamiento puede ser explicado por ARLORIO *et al.* (2008) indica que las alteraciones que suceden en la fracción polifenólica del grano de cacao están basados en los pre tratamientos de calor (tostado tradicional 100°C , aire caliente o calor infrarrojo), provocando la disminución del amargor y la astringencia en el grano. El mismo autor reporta en cacao de Ghana no tostado tuvo $1,423 \pm 0,080$ g Equiv. Catequina/100 g y cacao tostado $0,644 \pm 0,019$ g Equiv. Catequina /100 g, comparando con el grano de cacao ecuatoriano no tostado se tuvo $1,716 \pm 0,014$ 45 y cacao tostado $1,156 \pm 0,179$ g Equiv. Catequina

/100 g, esto indica que la disminución de polifenoles varía en función al clon de cacao, en el grano de cacao ecuatoriano se aprecia que disminuyo 32,63 % y en el de Ghana 54,74 %.

En los granos de cacao CCN-51 realizando el análisis estadístico se encontró diferencia altamente significativa (A-Ic), cabe resaltar que el mayor contenido de polifenoles se encontró en los granos de cacao fresco $9,209 \pm 0,034$ g EAG/100g al respecto OTHMAN *et al.* (2007) indica que en granos de cacao no fermentados el contenido de polifenoles es alto alrededor del 12 a 18% (peso seco). Seguido al contenido de polifenoles de grano fresco tenemos a los granos de cacao fermentado $7,799 \pm 0,015$ g EAG/100g al respecto ORTIZ *et al.* (2004) indica que la descomposición microbiana de la pulpa produce ácidos acético y láctico que son difundidos al cotiledón lo cual incrementa la acidez y provoca reacciones de hidrólisis y oxidación de pigmentos.

Seguido al contenido de polifenoles de granos fermentados tenemos a los granos de cacao seco $7,547 \pm 0,038$ g EAG/100g con respecto a los granos fermentados el contenido de polifenoles ha disminuido esto puede ser explicado por ORTIZ *et al.* (2004) que indica que durante el secado continua la fase oxidativa de la fermentación lo que juega un papel importante en la disminución de la astringencia, amargor, acidez del grano y el desarrollo del color marrón a partir de los compuestos fenólicos. Así mismo, ORTIZ *et al.* (2009) indica que en el secado varía el color del grano debido a que se desarrollan pigmentos marrones por las reacciones de condensación proteína a quinona que ocurre después de la oxidación enzimática de polifenoles tales

como las leucocianidinas y las epicatequinas.

PADILLA *et al.* (2008) en su investigación de evaluación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas encontró en *Teobroma cacao* L. $6,66 \pm 0,044$ g EAG/100 g.

Según NIEMENAK *et al.* (2006) indica que el contenido de compuestos fenólicos varía de acuerdo a los clones de donde provienen, aumenta hasta 25 % después de 2 días (SNK10, T79/467, UPA143) y decrece en otras entre 14 % y 25 % (ICS84 y ICS1) y en los clones SNK413, IMC60, ICS95 se mantiene constante. La disminución de polifenoles totales es debido a la difusión de este compuesto hacia afuera de los cotiledones y puede ser hasta 24 % después de 60 horas de fermentación llegando hasta 58% después de 8 días.

En el tostado del grano de cacao CCN-51 sufrió la mayor pérdida de polifenoles totales $7,332 \pm 0,035$ g EAG/100g este resultado al ser comparado con las referencias bibliográficas permite aducir que se debe a que los compuestos fenólicos en cacao está estrictamente correlacionado a la oxidación de estos compuestos a quinonas, seguidamente la polimerización y la formación de compuestos de color oscuro de alto peso molecular. Así mismo, CIENFUEGOS-JOVELLANOS *et al.* (2009) indica que las temperaturas altas y tiempos largos de tostado afectan el contenido de polifenoles.

5.2. Cuantificación de catequina en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

Del contenido de catequina en los granos de cacao Criollo y

CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado presentan diferencia estadística altamente significativa (A - IIa).

Con respecto al cacao Criollo se puede apreciar que existe diferencia altamente significativa (A - IIb) entre los tratamiento que corresponde a las etapas de beneficio y tostado. Del Cuadro 7 y Figura 10 se puede ver que el mayor contenido de catequina se encuentra en los granos frescos $4407,830 \pm 11,611$ mg Cat./Kg y el menor correspondió a los granos tostado $545,336 \pm 15,957$ mg Cat./Kg. Según NIEMENAK *et al.* (2006); OLIVIERO *et al.* (2009) indican que en los granos de cacao de diferentes países los polifenoles totales 93,76 % están conformados por antocianinas 58,60 %, epicatequina 21,60 % y catequina 14,06 %. Así mismo, NIEMENAK *et al.* (2006) reporta en grano fresco un contenido de 1442 mg Cat./Kg en la variedad IMC-60. Para el caso de granos fermentados y secados se encontró $664,183 \pm 7,699$ mg Cat. /Kg, al respecto GOTTI *et al.* (2006) reporta una comparación de contenido de catequina en granos de cacao procedentes de Camerún $450 \pm 0,010$ mg Cat. /Kg, Camerún $140 \pm 0,004$ mg Cat. /Kg y de Venezuela $60 \pm 0,060$ mg Cat. /Kg.

En los granos de cacao tostados se cuantificó $545,336 \pm 15,957$ mg Cat./Kg al respecto ANDRES-LACUEVA *et al.* (2008) en su investigación referido al contenido de flavanoles y flavonoles en productos de cocoa en polvo natural (10 – 12 % grasa) en la variedad Forastero reportó 216,26 mg Cat./Kg.

De los resultados Cuadro 7 y Figura 10 de la cuantificación de catequina en la variedad de cacao CCN-51 se puede apreciar que entre las etapas de beneficio y tostado presentan diferencia estadística altamente significativo (A-IIc), el mayor contenido de catequina se encuentra en los

granos de cacao fresco $5077,770 \pm 3,601$ mg Cat/Kg y el menor contenido lo tuvo los granos de cacao tostado con $654,046 \pm 1,849$ mg Cat/Kg. Como se puede notar cada etapa afecta el contenido de catequina RADOJCIC *et al.* (2009) indica que cada etapa de proceso afecta químicamente los componentes, durante la fermentación los polifenoles están sujetos a modificaciones bioquímicas debido a la oxidación y polimerización de proteínas decreciendo su solubilidad y disminuyendo su astringencia; durante el secado la cantidad de polifenoles se reduce sustancialmente debido al pardeamiento enzimático y en el proceso de tostado se reduce el amargor y la acidez causados por pequeños cambios en la concentración de polifenoles.

Según NIEMENAK *et al.* (2006) en granos de cacao sin fermentar reporta 1442 mg Cat/Kg en la variedad IMC60 y 332 mg Cat/Kg en la variedad ICS1. ANDRES-LACUEVA *et al.* (2008) reporta 216,26 mg Cat/Kg en cocoa en polvo de la variedad forastero; GOTTI *et al.* (2006) indica que el contenido de catequina varía según la procedencia y variedad del grano de cacao, en este caso reporta para granos de cacao secado $450 \pm 0,1$ mg Cat/Kg Camerún1, Camerún2 $140 \pm 0,04$ mg Cat/Kg y $60 \pm 0,08$ mg Cat/Kg Venezuela. RADOJCIC *et al.* (2009) reporta el contenido de catequina en licor de cacao de varios países e indica que entre ellos existe una gran variación $420 \pm 0,48$ mg Cat/Kg Venezuela, $340 \pm 0,40$ mg Cat/Kg en granos Sao Tome, $110 \pm 0,01$ mg Cat/Kg México y 20 mg Cat/Kg de Ecuador.

Comparando los granos de cacao de la variedad Criollo y CCN-51 se encuentra que el mayor contenido de catequina presenta el grano fresco de la variedad CCN-51 $5077,770 \pm 3,601$ mg Cat/Kg y el menor corresponde a la

variedad de cacao Criollo tostado $545,336 \pm 15,95$ mg Cat/Kg. Esta variación es justificado por OLIVIERO *et al.* (2009) en una investigación de sistema modelo de granos de cacao en el tostado demostró que las catequinas se degradan 30% en esta etapa. LEE *et al.* (2003) indica que los monómeros de catequina son considerados como los responsables de la actividad antioxidante en Té y chocolate la cantidad puede variar por factores de variedad y clones; así mismo, ANDRES-LACUEVA *et al.* (2008) manifiesta que el contenido de flavonoides es variable y está afectado por el tipo de cultivar, geografía, origen, factores medioambientales prácticas agrícolas, el manejo pos cosecha y el procesamiento.

5.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado

5.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical 1,1-diphenil-2-picrylhidrazil (DPPH)

La capacidad antioxidante desempeña un papel muy importante en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos, para poder evaluar estos efectos se utilizan sistemas in Vitro (radical 1,1-diphenil-2-picrylhidrazil (DPPH); 2,2-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline - 6-sulfonicacid) ABTS, poder antioxidante de reducción del Fe^{3+} -2,4,6-tripirydil-s-triazine (TPTZ) FRAP, etc.

De los resultados del IC_{50} del radical DPPH en los granos de cacao criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado se puede apreciar que existe diferencia estadística altamente significativa (A – IIIa).

Con respecto a los resultados del coeficiente de inhibición del radical DPPH de los granos de cacao criollo se presentan en el Cuadro 8 y Figura 11. Realizado el análisis estadístico se encontró que existe diferencia significativa (A-IIIb), comparando las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se encontró que el grano de cacao Criollo fresco tuvo el menor IC_{50} $52,846 \pm 0,38 \mu\text{g} / \text{mL}$ frente al radical libre. Con respecto a este resultado en la cuantificación de polifenoles totales el grano fresco de cacao Criollo tuvo el mayor contenido $7,911 \pm 0,037 \text{ g EAG} / 100\text{g}$, pero cuando se le somete frente al radical DPPH pierde su capacidad de inhibición, esto puede ser explicado por ARLORIO *et al.* (2008) que reporta en su investigación que no pudo demostrar en el sistema *in vitro* una correlación entre el contenido total de polifenoles y la actividad antiradical; OTHMAN *et al.* (2007) sugiere que la alta capacidad captar radicales DPPH en extractos de cacao no son exclusivo de los polifenoles.

Con respecto a las etapas de fermentado y secado en los granos de cacao Criollo se encontró diferencia estadística significativa. La mejor eficiencia para inhibir al radical DPPH correspondió al grano fermentado $41,500 \pm 0,52 \mu\text{g} / \text{mL}$, seguido del grano seco $43,041 \pm 0,16 \mu\text{g} / \text{mL}$. Sin embargo la eficiencia de inhibir radicales libres en la etapa de fermentado no es muy clara, al respecto OTHMAN *et al.* (2007) indica que cada metabolito analizado tiene un comportamiento o solubilidad determinado, no todos se comportan igual, a decir, en un extracto de cacao tratados con metanol son solubles las xantinas (teobroma y cafeína), menos flavonoides y pigmentos que pueden influenciar en la capacidad antioxidante/antiradical. Por el contrario, en medio acuoso son solubles (-) epicatequina, (+) catequina y quercitina. Por esta razón para

cuantificar la real actividad antioxidante se debe considerar la indisponibilidad *in vivo*. Así mismo, puede influenciar la concentración del antioxidante, medio de extracción, temperatura, pH, estructura química y posición de la molécula.

En el mismo cacao Criollo el grano tostado presentó poca eficiencia frente al radical DPPH $47,437 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$, este comportamiento puede ser explicado por MILLER *et al.* (2009) que indica que la capacidad antioxidante puede ser afectada por muchos factores como el tostado, proceso de fermentación por que en estas etapas decrece el contenido de flavonol en los granos de cacao, el mismo autor indica que la actividad antioxidante está determinada por el contenido de polifenoles, flavonoles como (-) epicatequina, (+) catequina, y otros oligómeros conocidos como proantocianidinas.

Analizando los resultados del CCN-51 los resultados del IC_{50} entre las etapas estas presentaron diferencia estadística significativa (A-IIIc), al respecto según la comparación de medias la mayor eficiencia frente al radical DPPH se encontró en los granos de cacao fresco $38,754 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$, seguido por los granos de cacao fermentado $49,977 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ y la menor correspondió al tostado $52,716 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$, este comportamiento puede ser explicado por ARLORIO *et al.* (2008) que reporta en extracto metanólico en cacao no fermentado de Gana $IC_{50} 30,100 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$, en cacao tostado $IC_{50} 34,761 \pm 2,018 \mu\text{g/mL}$, cacao de Ecuador no fermentado $IC_{50} 14,986 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$ y cacao tostado $IC_{50} 26,546 \pm 2,107 \mu\text{g/mL}$, cacao de Costa de Marfil no fermentado $IC_{50} 20,748 \pm 3,566 \mu\text{g/mL}$ y tostado $IC_{50} 27,008 \pm 2,507 \mu\text{g/mL}$.

De los resultados del Cuadro 8 sobre el CCN-51 las etapas de secado y tostado no presentaron diferencia estadística significativa, esto indica

que los resultados en las dos etapas no tiene buena eficiencia frente al radical DPPH, los que tuvieron menor eficiencia fueron el cacao seco $52,493 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$ y tostado $52,716 \pm 0,46$ $\mu\text{g/mL}$, al respecto CIENFUEGOS-JOVELLANOS *et al.* (2009) manifiesta que la actividad antioxidante varía según la variedad botánica, factores de manufactura, tales como manejo de poscosecha, fermentación, secado, tostado y tratamiento de alcalinización. El mismo, cita que un 90 % decae en la concentración de epicatequina después de la fermentación y secado. Decrecimiento significativo del contenido de flavonoides después del proceso de fermentación y tostado en granos de cacao secados al sol. También decrecen 3 - 5 veces los niveles de procianidinas durante la fermentación.

En la Figura 11 se puede observar que la mayor eficiencia frente al radical DPPH correspondió al cacao CCN-51 fresco $38,754 \pm 0,52$ $\mu\text{g/mL}$ y los menos eficientes fueron Criollo fresco $52,846 \pm 0,38$ $\mu\text{g/mL}$, CCN-51 seco $52,493 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$ y tostado $52,716 \pm 0,46$ $\mu\text{g/mL}$, Según LEE *et al.* (2003) indica que el cacao tiene alta actividad antioxidante de compuestos fitoquímicos fenólicos expresados en equivalente de vitamina C, VCEACs 1128 mg y 836 mg frente a radical ABTS y DPPH, este comportamiento fue ordenado considerando primero al cacao, vino rojo, te verde y te negro.

Comparando la actividad antioxidante de los granos de cacao se puede afirmar que este tiene una alta actividad antioxidante según MILLER *et al.* (2009) menciona que el cacao y el chocolate son productos muy bien conocidos por tener flavan-3ol (flavonol) compuesto polifenólico, el cual tiene actividad antioxidante significativa. Así mismo, GUTIERREZ (2002) indica que en cacao y chocolate tiene catequina y proantocinidinas las cuales tiene fuerte actividad

antioxidante in vitro, como demuestra al comparar las catequinas del chocolate con las de té, el cual muestra un efecto antioxidante 4 veces mayor, siendo las catequinas sus oligómeros unidos por enlace C₄ y C₈ las de mayor efecto.

5.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC₅₀) del radical peroxilo

Los granos de cacao son ricos en antioxidantes específicas, debido a la estructura de las catequinas y epicatequinas. Posiblemente estos compuestos son los que le confieren a la grasa del chocolate la particular resistencia a la peroxidación. Los resultados del coeficiente de inhibición (IC₅₀) del radical peroxilo en los granos de cacao Criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado presento diferencia estadística significativa (A - IVa).

Con respecto al cacao Criollo Cuadro 9 y Figura 12 comparando los resultados encontramos que entre las etapas existe diferencia estadística significativa, (A-IVb), estos resultados nos indican que la mayor eficiencia frente al radical peroxilo se encontró en el grano fresco IC₅₀ 8,934±0,09 µg/mL, comparando este resultado con la prueba de DPPH es diferente este grano fresco tuvo la menor eficiencia IC₅₀ 52,846±0,38 µg/mL, esto puede ser explicado por KUSKOSKI, *et al.* (2005) que indica que la capacidad antioxidante de una mezcla no viene dado solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios, por esta razón se recomienda utilizar diferentes compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD,

DMPO Y FRAP) que son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos con acción antioxidante que sirven para captar los radicales libres generados. Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin preparación previa, mientras que el ABTS es generado por reacción química. Así mismo, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico y DMPD solo en medio acuoso. En la investigación el peroxilo es un radical que se genera y solo se disuelve en medio acuoso.

La menor eficiencia correspondió al grano de cacao Criollo seco IC_{50} 11,014 $\mu\text{g/mL}$, según CROS (2000) indica que en el secado suceden muchas reacciones tales como la reducción del contenido de ácido acético por evaporación, oxidación de los polifenoles y la síntesis de aldehídos. ORTIZ *et al.* (2009) indica que el aspecto relevante del secado es que continúa la fase oxidativa iniciado en la fermentación y se completa la formación de los compuestos del aroma y sabor. Además en esta etapa ocurre el desarrollo de los pigmentos de color marrón a partir de los compuestos fenólico.

Según los resultados de los granos de cacao CCN-51 Cuadro 9 y Figura 12 el IC_{50} determinado también presentó diferencia estadística significativa (A-IVc), la mayor y menor eficiencia frente al radical peroxilo se encontró en el cacao fresco $7,248 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ y tostado $9,767 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, este comportamiento es similar al comportamiento al DPPH; así mismo, la mayor concentración de polifenoles se encontró en granos frescos. Según TOMAS-BARBERAN *et al.* (2007) manifiesta que el CCN-51 es

un clon híbrido ecuatoriano rico en flavonoides comparado a la variedad Criollo de Republica Dominicana. NIEMENAK *et al.* (2006) indica que la actividad antioxidante, calidad y cantidad de los compuestos fenólicos es variable, obedece a la genética, diversidad del medio ambiente (microclimas), condiciones de crecimiento tales como la intensidad de luz, humedad, temperatura, uso de fertilizantes y factores de estrés. Los compuestos fenólicos encontrados en cacao de Camerún son diferentes a Ghana y Malasia.

VI. CONCLUSIONES

- El contenido de polifenoles totales, catequinas y actividad antioxidante (DPPH y radical peroxilo) varía en las etapas de beneficio (grano fresco, fermentado y secado) y tostado en cacao Criollo y CCN-51.
- El mayor y menor contenido de polifenoles totales correspondió a grano de cacao CCN-51: fresco $9,209 \pm 0,034$ g EAG/100g y tostado $7,332 \pm 0,035$ g EAG/100g.
- El mayor contenido de catequina en granos de cacao en las etapas de beneficio y tostado correspondió a CCN-51 fresco $5077,770 \pm 3,601$ mg Cat /Kg y el menor contenido Criollo tostado $545,336 \pm 15,957$ mg Cat /Kg.
- La mayor eficiencia frente al radical DPPH correspondió al cacao CCN-51 fresco $IC_{50} 38,754 \pm 0,52$ μ g/mL y los menos eficientes fueron el Criollo fresco $IC_{50} 52,846 \pm 0,38$ μ g/mL, CCN-51 seco $IC_{50} 52,493 \pm 0,29$ μ g/mL y tostado $IC_{50} 52,716 \pm 0,46$ μ g/mL.
- La mayor eficiencia frente al radical peroxilo se encontró en el cacao CCN51 fresco $7,248 \pm 0,09$ μ g/mL y los menores fueron cacao Criollo seco $IC_{50} 11,014 \pm 0,06$ μ g/mL y tostado $IC_{50} 10,719 \pm 0,03$ μ g/mL.

VII. RECOMENDACIONES

- Cuantificar el contenido de antocianinas en poblaciones de cacao Criollo, Forastero, Trinitario y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.
- Realizar estudios de actividad antioxidante en el proceso de obtención de chocolate.
- Investigar el contenido de compuestos bioactivos en productos derivados del cacao (manteca, licor y polvo de cacao).
- Evaluar el comportamiento de actividad antioxidante en cacao comercial (mezcla de granos de todas las poblaciones de cacao).
- Estudiar los subproductos (cascarilla y exudado de cacao), en el contenido de polifenoles y actividad antioxidante.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEBY, G., RODRIGUEZ, A. 2002. Manual sobre el manejo post cosecha del cacao. Confederación Nacional de Cacaocultores Dominicanos. CONACADO. República Dominicana. p. 57 – 61.
- ANDERSON, D y PHILLIPS, B. 2001. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 37: 1015 – 1025.
- ANDREOLI, T. E. 2000. Free radicals and oxidative stress. *J. Am. Med.* 180: 650 – 651.
- ANDRES-LACUEVA, C., MONAGAS, M., KHAN, N., IZQUIERDO-PULIDO, M., URPI-SARDA, M., PERMANYER, J., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. 2008. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *J. Agric. Food Chem.* 56 (9): 3111 – 3117.
- ARLORIO, M., LOCATELLI, M., TRAVAGLIA, F., COISSON, J., DEL GROSSO, E., MINASSI, A., APPENDINO, G., MARTELLI, A. 2008. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao L.*). *Food Chemistry. Novara, Italy* 106: 967 – 975.

- ARÉVALO, E. 2004. Cacao manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonía peruana. Ed. Del Castillo. Chiclayo-Perú. p. 115 – 127.
- AVELLO, M., SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- BRAUDEAU, J. 1981. El Cacao Colección Agricultura Blume. Barcelona – España. 279 p.
- BORS, W., HELLER, W., CRISTA, M., COLS. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods enzymol.* 186: 343 – 355.
- CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E., DEL MAR QUIÑONES, M., MUGUERZA, B., MOULAY, L., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. 2009. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J. Agric. Food Chem. Madrid Spain.* 57 (14): 6156 – 6162.
- CHESMAN, E. E. 1944. Fertilization and embryogeny in (*Theobroma cacao L.*). *Ann. Of. Bot.* 41 (161): 107 – 127.
- CLARCKSON, P. M., THOMPSON, H. S. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? 1. *Am. Soc. Clin. Nutr. USA.* 72 (suppl): 637S – 46S.
- CRESPO, E. y CRESPO, F. 1997. Cultivo y beneficio del cacao CCN-51. Ed. El Conejo. 94 p.

- CROS, E. 2000. Factores condicionantes de la calidad del cacao. Memorias del primer congreso venezolano del cacao y su industria, Maracay, estado Aragua. 16 – 28 p.
- DAS, DK. 1994. Naturally. Accuaring falvonoids: structure chemistry, and high – performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Emzimol.* 234: 410 – 420.
- DIPLOCK, A. 1991. Antioxidant nutrients and disease prevention and overview *Am J. Clin. Nutr.* 53: 93 – 189.
- DING, M., YANG, H., XIAO, S. 1999. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography. *J. Chromatorgr. A 849:* 637 – 640.
- ESPINOZA, J., MITE, F., CEDEÑO, S., BARRIGA, S., ANDINO, J. 2006. GIS-based site-specific management of cocoa. Northern Latin American. Vol. 90: 36 – 39 p.
- GAITÁN, N. T. 2005. Cadena del cultivo de cacao (*Theobroma cacao L*) con potencial exportador. Managua
- GONZALES-TORRES, M., BETACOURT-RULE, M., ORTIZ-MUÑIZ, R. 2000. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. Mexico.* 25 (1): 3 – 9 p.
- GORMAZ, A. J. 2005. Extracto hidroalcohólico de *bluddleja globosa* y extracto seco de *rosamarinus officinales* como preservante de filetes de *oncorhynchus mykiss*. Optar el título de bioquímico. Universidad de Chile de la facultad de ciencia química y farmacéutica, departamento de química, farmacología y toxicología, laboratorio de farmacología.

Santiago de Chile. 38 p.

- GOTTI, R., FURLANETTO, S., PINZAUTI, S., CAVRINI, V. 2006. Analysis of catechins *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography*. 1112: 345 – 352.
- GUTIÉRREZ, A. 2002. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. Departamento de Ciencias Médicas “Zerafín Ruíz de Zárate Ruíz”, Carretera de Acueducto y Circunvalación, Santa Clara, Cuba. *Acta farm. Bonaerense* 21 (2): 149 – 152.
- HALLER, W., FORKMANN, G. 1993. Biosynthesis, in the flavonoides. *Advances in research since 1986*(Harbone JB9). Chapman and Hall Ltda. London. 499 – 535 p.
- HALLIWELL, A., GUTTERIDGE, J. M., AROUNA, O. J. I. 1987. The deoxyribose method. A simple “test – tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochem.* 165: 215 – 219.
- HALLIWELL, B. 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 70: 737 – 757 p.
- HARDY, F. 1970. *Manual del Cacao*. Editorial Turrialba. Costa Rica. 430 p.
- HOPIA, I., KOHKONEN, P., VOURELA, J., RAHUA, P., PIHLAJA, K., KUJALA, S., HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47 (101): 1347 – 1349.
- HORIE, KOHATA, K. 2000. Analysis of tea components by high performance liquid chromatography and high – performance capillary electrophoresis. *J. Chrom*

A 881: 4725 – 4738.

HAVSTEEN, B. 1983. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem pharmacol.* 32: 1141 – 1148.

HERNANDEZ, T. 1991. Cacao: sistema de producción en la amazonia peruana. Proyecto de promoción agroindustrial D/PER/86/456/UNFDAC – PNUD/OSP. Tingo María, Perú. 70 p.

ICT. 2003. Informe anual de proyecto de renovación y rehabilitación de plantaciones de cacao en la Cuenca del Huallaga. Instituto de cultivos Tropicales. Tarapoto Perú. 122 p.

KUSKOSKI, E., ASUERO, A., TRONCOSO, A., MANCINI-FILHO, J., FETT, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos. Campinas.* 25 (4): 726 – 732.

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.* 51 (25): 7292 – 7295.

LEON, J. 1968. *Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales* IICA, San José, Costa Rica. 375 – 384 p.

LEWIS, S. R., IRVING, S. N. 1992. *Diccionario de química y de productos químicos.* Ediciones Omega. S.A. Barcelona España. 1170 p.

LÓPEZ, A., GARCÍA, N., VASCONCELOS, M. 2003. Avaliação das condições de torração após a fermentação de amendoas de Cupuacu (*Theobroma grandiflorum schum*) e Cacao (*Theobroma cacao L*). *Brazilian Journal. Food Technology.* 6 (2): 309 – 316.

- MAZZA, G. 1998. Functional food: Biochemical & processing. Aspect technomic publish Co., Inc. Canadá. 359 p.
- MARTINEZ-FLORES, J., GONZALES-GALLEGO, J., CULEBRAS M., TUÑÓN, M^a. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Departamento de Fisiología, Universidad de León y hospital de León España. 17: 271 – 278.
- MELCHOR, S. V. 2002. Procesamiento Tecnológico para la obtención de té verde (*Camellia sinensis*) determinación de su actividad antioxidante y cuantificación de flavonoles por HPLC. Trabajo de tesis para Optar el Título de INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María - Perú. 66 p.
- MILLER, K., APGAR, J., SWEIGART, D., STUART, A., MCHALE, N., KONDO, M., HURST, W. 2009. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin conten in foods prepared with cocoa powder. Journal of food science 74 (6): 398 – 404.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2000. Estadística del cacao (*Theobroma cacao L.*) OIA. AA – Lima, Perú.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2004. Manual del cultivo de cacao. Lima Perú. 130 p.
- NIELSEN, S. 1998. Food analysis 2^{da}. Edic. Ed. Services Ruthbloom. Usa. 487 – 526 p.
- NIEMENAK, N., ROHSIUS, C., ELWERS, S., OMOKOLO, D., LIEBEREI, R. 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao L.*) clones

- in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of food composition and analysis*. Hamburg, Germany. 19: 612 – 619.
- 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.* 57 (1): 147 – 1152.
- ORTIZ, L., CAMACHO, G., GRAZIANI, L. 2004. Efecto del secado al sol sobre la calidad del grano fermentado de cacao. *Agronomía trop.* 54 (1): 31 – 43 p.
- ORTIZ DE BERTORELLI, L., GRAZIANI, L., ROVEDAS, G. 2009. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Trop.* 59(2): 119 – 127.
- OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N., ADENAN, I. 2007 Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*. Kuala Lumpur, Malaysia. 100: 1523 – 1530.
- PADILLA, F., RINCON, A., BOU-RACHED, L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Unidad de Análisis de Alimentos. Caracas, Venezuela. 58 (3): 303 – 308.
- POLYAKOV, N., LESHINA, T., KONOVALOVA, T., KISPERT, L. 2001. Carotenoids as scavengers of free radicals in fenton reaction. *Antioxidants or pro-oxidants. J. Free. Rad. Biol. Med.* 31(3): 398 – 404.
- PSZCZOLA, D. E. 2001. Antioxidants from preserving food quality to quality of life. *Food Tech.* 56 (6): 51.

- QUEIROZ, M. B. 1999. Estudo dos parâmetros de torraçao de amendoas de cupuacu (*Theobroma gradiflorum*). Dissertacao. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. 109 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. 27 (5): 330 – 337.
- REILLY, P. y BULKEY, G.1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites, Br J Surg. 77 p.
- ROSALES, C. y GONZALES, L. 2003. Comparación de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. Artículo de investigación. 16 – 47 p.
- RODRIGUEZ, P., D'AMICO, N., DE PASQUALE, R., COSTA, G. 2001. Effects of *Vaccinium myrtillus* Anthocyanins on Triiodothyronine Transport in the Rat. Pharmacol. Res. 22 (Suppl. 3): 59 – 60 p.
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ANGELES, F. 2001. Técnicas de Investigación para determinar la actividad antioxidativa y anti-inflamatorio de plantas medicinales de la Amazonia. international workShop. Iquitos - Perú. 1 – 25 p.
- SIES, H.1997. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. Vol.38. USA. Academia Press Inc. 293 p.
- SORIA, J. V. 1 987. Informes sobre los hallazgos de plantas de cacao silvestres en la amazonia y cacao criollo en Latinoamérica y México. I foro Intern. Cacao. FUPAD. San José. Costa Rica. p. 1 – 10.
- SULLCA, B. 1992. Tecnificación del cacao en la selva peruana. Fundeagro. Lima – Perú.

- THOMAS, M. 2000. The Role of Free Radicals and Antioxidants. *Nutrition*. 16(7/8): 716 – 718.
- TOMAS-BARBERAN, F., CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E., MARIN, A., MUGUERZA, B., GIL-IZQUIERDO, A., CERDA, B., ZAFRILLA, P., MORILLAS, J., MULERO, J., IBARRA, A., PASAMAR, M., RAMON, D., ESPIN, J. 2007. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J. Agric. Food Chem. Valencia, Spain*. 55 (10): 3926 – 3935.
- VELLOSO, M. 1985. Manual do beneficiador do cacau. Departamento de extensao. CEPLAC. Brasil. 20 p.
- WAGNER, H., FARKAS, L. 1975. Synthesis of flavonoids. The flavonoids. Part I (Harborne JB, Mabry TJ and Mabry H eds). Academic Press, New York. p. 127 – 213.
- WEISBURGER, J. H. 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables tomatoes and tea. *Food Chem. Toxicol.* 37: 943 – 948.
- WOOD, G. A. R. 1982. Cacao. Ed. Continental. S.A. México. 363 p.
- YILDIRIM, A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activity of *Rumex crispus L.* extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4083 – 4089 p.
- ZHAO, J., WANG, J., CHEN, Y., AGARWAL, R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse using two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* 20 (9): 1737 – 1745.

ZÚÑIGA, M. M. 2005. Caracterización de la fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Ingeniero en Ciencias Agrarias Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Chile. 68 p.

ANEXO

A-la Análisis de varianza cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100g muestra), tipo de cacao por etapas de beneficio y tostado

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig
Tratamientos	7	12,300829	1,757261	431,83	0,0001	**
Cacao	1	0,837234	0,837234	205,74	0,0001	**
Etapas/BT	3	8,299171	2,76639	679,81	0,0001	**
Cacao*Etapas/BT	3	3,164425	1,054808	259,21	0,0001	**
Error experimental	32	0,130219	0,004069			
Total	39	12,431049				

$R^2 = 0,989525$ $CV = 0,814995$ $MSE = 0,063791$ $Media = 7,827225$

A-lb. Análisis de varianza de polifenoles totales (g EAG/100g muestra) de cacao Criollo en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas B/T	3	0,70745	0,23582	75,80	0,0001	**
Error experimental	16	0,04977	0,00311			
Total	19	0,75723				

$R^2 = 0,934263$ $CV = 0,726028$ $MSE = 0,055777$ $Media = 7,682550$

A-lc. Análisis de varianza de polifenoles totales (g EAG/100g muestra) de cacao CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas B/T	3	10,75614	3,58538	713,14	0,0001	**
Error experimental	16	0,08044	0,005027			
Total	19	10,83659				

$R^2 = 0,992577$ $CV = 0,889442$ $MSE = 0,070905$ $Media = 7,971900$

A-IIa Análisis de varianza cuantificación de catequina (g Cat./Kg muestra), tipo de cacao por etapas de beneficio y tostado

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig
Tratamientos	7	72285735,1	10326533,6	27406,3	0,0001	**
Cacao	1	294634,04	294634,04	781,95	0,0001	**
Etapas/BT	3	71561299,5	23853766,5	63307,1	0,0001	**
Cacao*Etapas/BT	3	429801,48	143267,16	380,23	0,0001	**
Error experimental	16	6028,71	376,79			
Total	23	72291763,76				

$R^2 = 0,999917$ $CV = 1,103121$ $MSE = 19,41119$ $Media = 1759,661$

A-IIb. Análisis de varianza de catequina (mg Cat./Kg muestra) de cacao Criollo en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas B/T	3	30747635,29	10249211,76	30171,5	0,0001	**
Error experimental	8	2717,59	339,70			
Total	11	30750352,88				

$R^2 = 0,999912$ $CV = 1,117796$ $MSE = 18,43091$ $Media = 1648,862$

A-IIc. Análisis de varianza de catequina (mg Cat./Kg muestra) de cacao CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas	3	41243465,7	13747821,91	33216,1	0,0001	**
Error experimental	8	3311,12	413,89			
Total	11	41246776,8				

$R^2 = 0,999920$ $CV = 1,087662$ $MSE = 20,34429$ $Media = 1870,460$

A-IIIa Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH, tipo de cacao por etapas de beneficio y tostado

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig
Tratamientos	7	1971,2940	281,6134	171,58	0,0001	**
Cacao	1	93,4458	93,4458	56,94	0,0001	**
Etapas/BT	3	226,9704	75,6568	46,10	0,0001	**
Cacao*Etapas/BT	3	1650,8779	550,2926	335,29	0,0001	**
Error experimental	64	105,04115	1,641268			
Total	71	2076,3352				

R² = 0,949410 CV = 2,705898 MSE = 1,281120 Media = 47,34546

A-IIIb. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH de cacao Criollo en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas	3	699,85674	233,28558	178,47	0,0001	**
Error experimental	32	41,82917	1,30716			
Total	35	741,68591				

R² = 0,943603 CV = 2,474367 MSE = 1,143312 Media = 46,20622

A-IIIc. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH de cacao CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas	3	1177,99148	392,66828	198,78	0,0001	**
Error experimental	32	63,21198	1,97537			
Total	35	1241,20346				

R² = 0,949072 CV = 2,898812 MSE = 1,405480 Media = 48,48469

A-IVa Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo, tipo de cacao por etapas de beneficio y tostado

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig
Tratamientos	7	101,3288	14,4755	314,76	0,0001	**
Cacao	1	43,8188	43,8188	952,81	0,0001	**
Etapas/BT	3	56,8608	18,9536	412,13	0,0001	**
Cacao*Etapas/BT	3	0,64916	0,21638	4,71	0,0050	*
Error experimental	64	2,94330	0,04598			
Total	71	104,2721				

R² = 0,971773 CV = 2,295149 MSE = 0,214451 Media = 9,343653

A-IVb. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo de cacao Criollo en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas	3	23,85629	7,95209	215,74	0,0001	**
Error experimental	32	1,17950	0,03685			
Total	35	25,03580				

R² = 0,952887 CV = 1,896411 MSE = 0,191988 Media = 10,12378

A-IVc. Análisis de varianza de IC₅₀ del radical peroxilo de cacao CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. cal.	P _{valor}	Sig.
Etapas	3	33,65368	11,21789	203,52	0,0001	**
Error experimental	32	1,76379	0,05511			
Total	35	35,41748				

R² = 0,950200 CV = 2,741554 MSE = 0,234774 Media = 8,563528

Cuadro 10. Determinación de la curva estándar de ácido gálico.

Repeticiones	Concentraciones (mg AG/mL)					
	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
1	1,219	0,599	0,283	0,145	0,073	0,036
2	1,209	0,608	0,282	0,141	0,071	0,035
3	1,212	0,596	0,289	0,140	0,070	0,036
Promedio	1,213	0,601	0,285	0,142	0,071	0,036

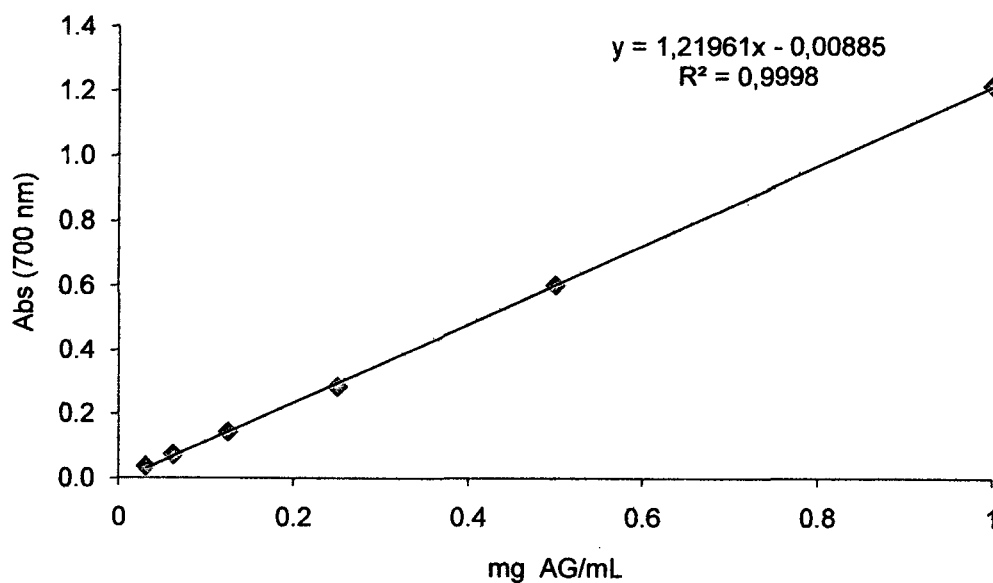


Figura 13. Representación de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.

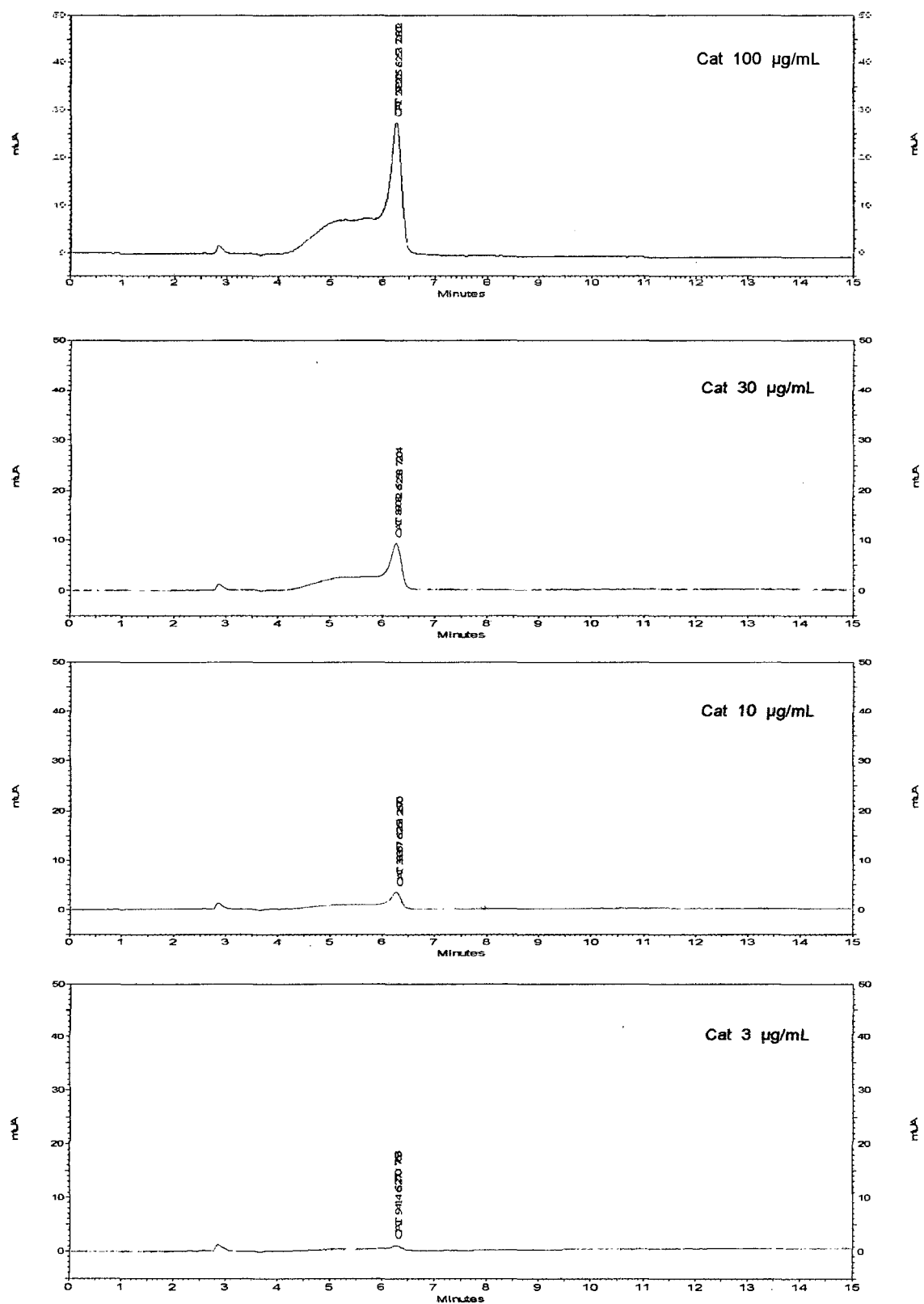


Figura 14. Cromatograma de la curva estándar de catequina (Cat) determinada por HPLC.

Cuadro 11. Determinación de la curva estándar de Catequina por HPLC.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Absorbancia (mUA)	Tiempo de retención (min)
100	298205	22802	6,253
30	89082	7204	6,258
10	33357	2670	6,263
3	9414	763	6,270
1	3957	286	6,250

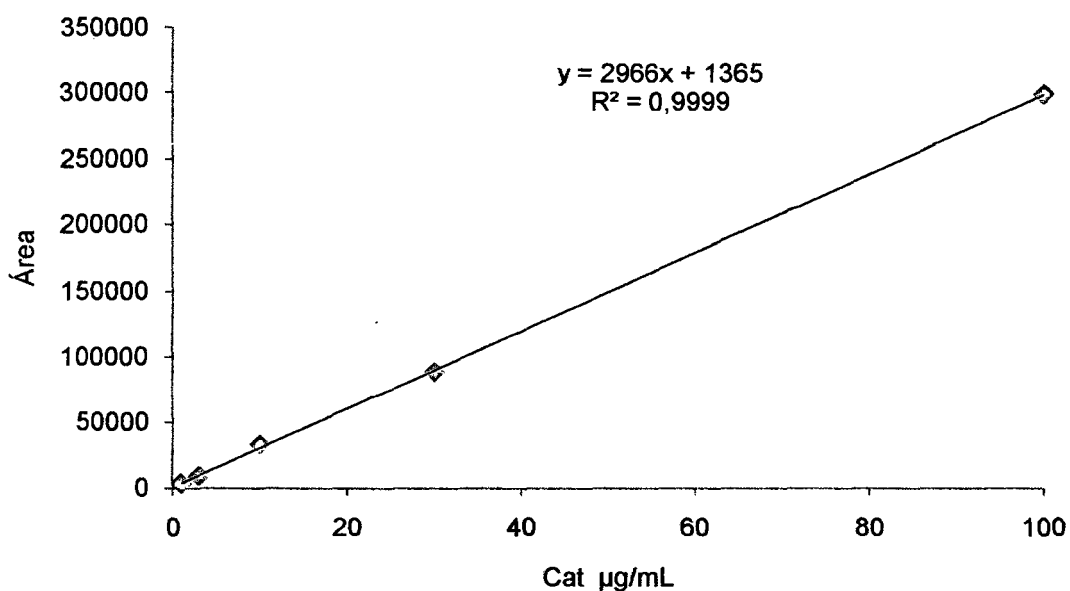


Figura 15. Representación de la curva estándar para la cuantificación de catequina.

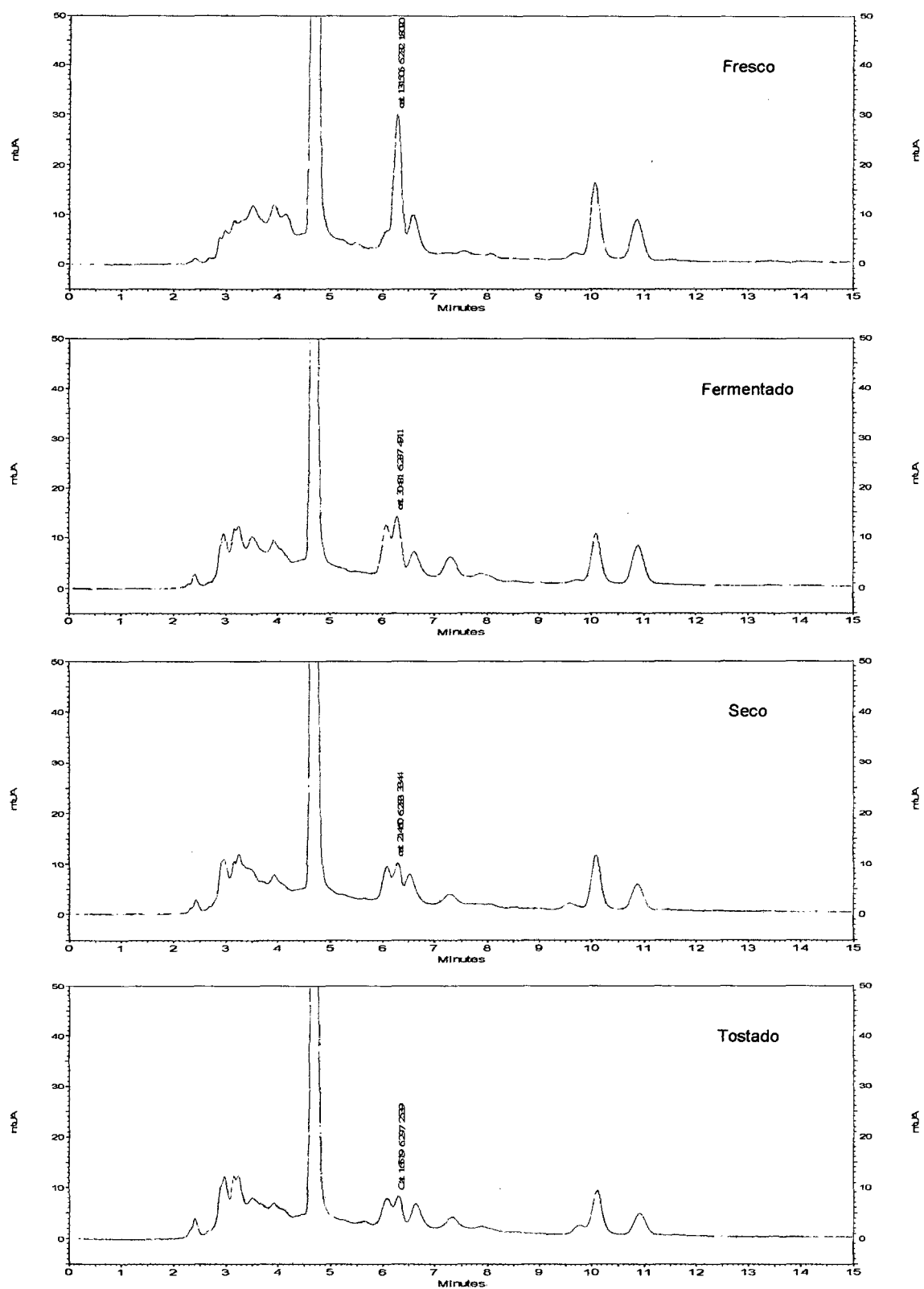


Figura 16. Cromatograma de catequina en cacao Criollo en las etapas de beneficio y tostado determinada por HPLC.

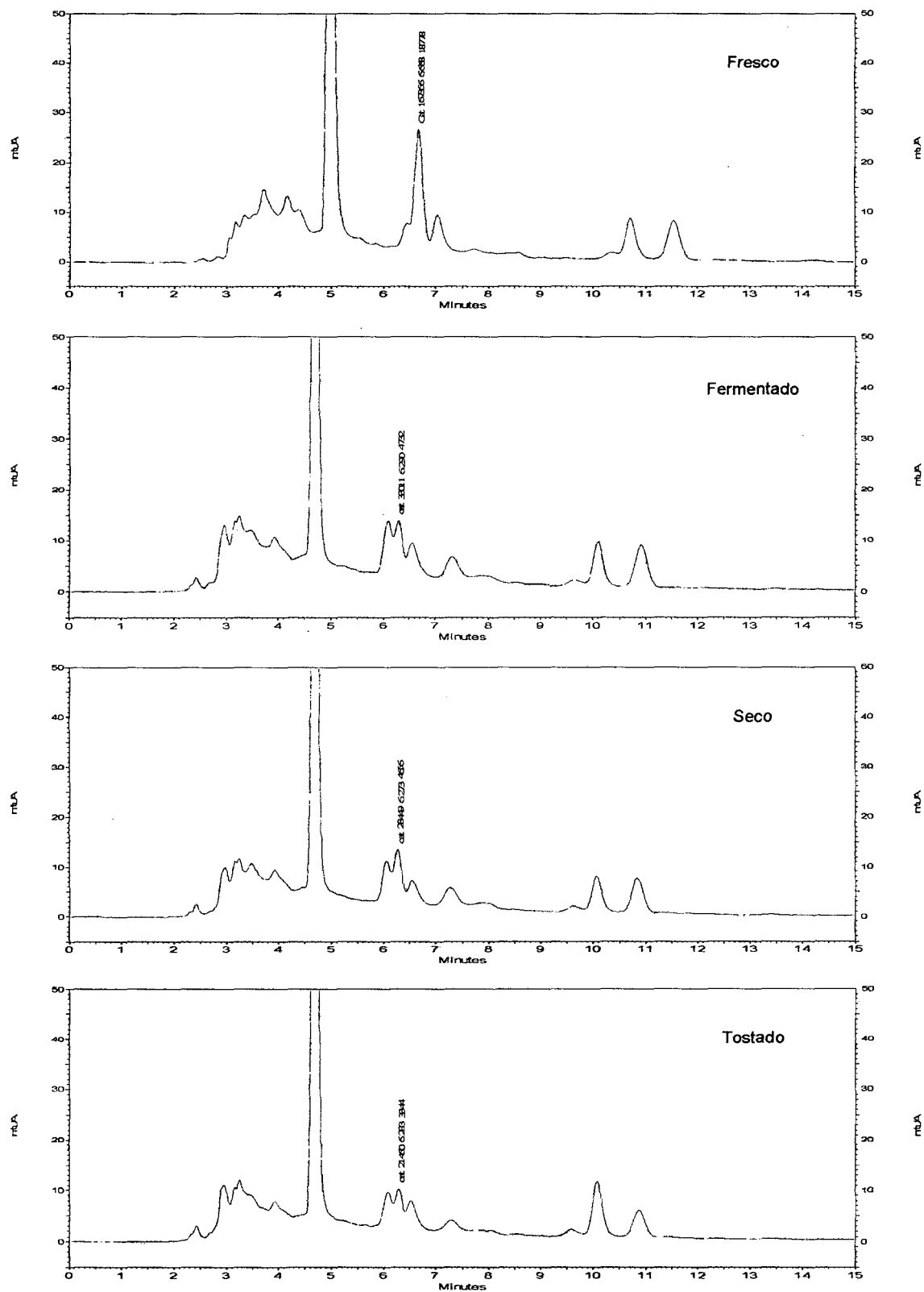


Figura 17. Cromatograma de catequina en cacao CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado determinada por HPLC.