

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



TESIS

**“GRASAS, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
(DPPH y ABTS) EN CHOCOLATES COMERCIALES”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

ELABORADO POR:

TRELLES NOCHE CARLOS DIAN

TINGO MARÍA – PERÚ

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María
FACULTAD DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Carretera Central Km. 1.21. Teléfono (062) 561385
Apartado Postal 156 Tingo María E.mail; fiia@unas.edu.pe

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 001-2019

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 19 de diciembre de 2018, a horas 7:26 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, región Huánuco, para calificar la tesis presentada por el Bach. **TRELLES NOCHE, Carlo Dian**, titulada:

“GRASAS, POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH y ABTS) EN CHOCOLATES COMERCIALES”

Después de haber escuchado la sustentación y 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 artículo 45° numeral 45.2, de la Ley Universitaria 30220; los artículos 132 inciso “k” y 135 inciso “f” del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 03 de enero de 2019

Dr. Pedro Pablo Peláez Sánchez
Presidente



Ing. Yolanda Jesús Ramírez Trujillo
Miembro

Dra. Elizabeth Susana Ordoñez Gómez
Asesora

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Cacao	3
2.1.1. Origen y distribución geográfica	3
2.1.2. Clasificación taxonómica	3
2.1.3. Composición química del grano de cacao	4
2.1.4. Derivados del cacao	4
2.2. chocolate.....	5
2.2.1. Breve historia del chocolate.....	5
2.2.2. Definición de chocolate.....	6
2.2.3. Ingredientes del chocolate	7
2.2.4. Composición química del chocolate	10
2.2.5. Tipos de chocolate.....	12
2.2.6. Proceso de la elaboración del chocolate	18
2.3. Polifenoles.....	20
2.3.1. Definición	20
2.3.2. Polifenoles presentes en el grano de cacao	22
2.4. Antioxidantes.....	23
2.4.1. Definición	23
2.4.2. Tipos de antioxidantes.....	24
2.4.3. Efectos antioxidantes del chocolate.....	24
2.5. Radicales libres y el chocolate	25

III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Lugar de ejecución	28
3.2. Muestras	28
3.3. Materiales, equipos de laboratorio y reactivos	30
3.3.1. Materiales de laboratorio	30
3.3.2. Equipos de laboratorio.....	30
3.3.3. Reactivos y solventes	30
3.4. Métodos de análisis.....	31
3.5. Metodología experimental	31
3.5.1. Determinación del contenido de grasa en chocolates comerciales	31
3.5.2. Preparación del extracto hidroalcohólico	32
3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en chocolates comerciales	33
3.5.4. Determinación de la capacidad antioxidante en chocolates comerciales	35
3.5.5. Análisis multivariado – componentes principales	40
3.6. Diseño experimental.....	41
3.7. Análisis estadístico.....	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. Contenido de grasa en chocolates comerciales	44
4.2. Polifenoles totales en chocolates comerciales	48
4.3. Capacidad antioxidante en chocolates comerciales.....	55

4.3.1. Capacidad de inhibir el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	55
4.3.2. Capacidad de inhibir el radical libre 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS ^{o+})	59
4.4. Análisis de multivariado – componentes principales	62
V. CONCLUSIONES	66
VI. RECOMENDACIONES.....	67
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO	89

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido promedio de 100 g de chocolate.....	11
2	Tipos y requisitos de chocolates por su forma.....	13
3	Tipos y requisitos de chocolates por su composición.....	14
4	Descripción de las muestras de chocolates comerciales.....	29
5	Concentraciones de trabajo para determinar polifenoles.....	34
6	Concentraciones de trabajo para el radical DPPH en chocolates comerciales.....	35
7	Volúmenes necesarios para la preparación de las diferentes concentraciones para determinar el IC ₅₀ frente al radical DPPH	37
8	Concentraciones de trabajo para el radical ABTS ^{°+} en chocolates comerciales.....	38
9	Preparación de las diferentes concentraciones para determinar el coeficiente de inhibición (IC ₅₀) para el radical abts.....	39
10	Contenido de grasa en chocolates comerciales.....	45
11	Contenido de polifenoles totales en chocolates comerciales.....	50
12	Resultados del IC ₅₀ del radical DPPH en chocolates comerciales.....	56
13	Resultados del IC ₅₀ del radical ABTS ^{°+} en chocolates comerciales.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diseño experimental para la cuantificación de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS).....	41
2	Representación del contenido de grasa en chocolates comerciales.....	44
3	Representación del contenido de polifenoles totales en chocolates comerciales	49
4	Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en chocolates comerciales.....	55
5	Comportamiento del IC ₅₀ frente al radical ABTS ^{o+} en chocolates comerciales.....	59
6	Comportamiento del biplot de grasa, polifenoles totales, radicales de DPPH y ABTS ^{o+} en los diferentes chocolates comerciales	63
7	Representación de análisis de conglomerados para chocolates comerciales.....	64

RESUMEN

La investigación se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María. Los objetivos fueron: cuantificar el contenido de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante mediante los radicales libres DPPH y ABTS⁰⁺ en chocolates comerciales. El contenido de grasa se determinó por el método de soxleth. Con las muestras de chocolate se preparó extracto hidroalcohólico (100mg/mL) para los análisis de polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS). Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA), y la prueba de Tukey ($p < 0,05$), análisis multivariado con componentes principales. El contenido de grasa vario $23,876 \pm 0,257$ a $37,926 \pm 0,141$ %. El mayor contenido de polifenoles fue para el chocolate con 45% de cacao ($1,853 \pm 0,035$ gEAG/100g), la capacidad antioxidante frente al radical DPPD tuvo un IC₅₀ de $210,78 \pm 4,83$ a $1987,92 \pm 34,34$ µg/mL, frente al radical ABTS⁰⁺ el IC₅₀ vario de $158,78 \pm 2,45$ a $988,55 \pm 6,21$. Del análisis de componentes principales (CP) los polifenoles (CP1) y la grasa (CP2) representan 97,5% de la variabilidad. Del Análisis de conglomerados se identificó 3 grupos, el primer grupo (pasta de cacao) el segundo (chocolate leche/almendras) y al tercer grupo pertenecen el resto de chocolates. En conclusión los chocolates comerciales estudiados tienen alto contenido de grasa, bajo contenido de polifenoles y actividad antioxidante.

I. INTRODUCCIÓN

El cacao es el ingrediente principal del chocolate, responsable de sus propiedades funcionales, pues posee altos niveles de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante significativa, asociándose el consumo de chocolate con una buena salud a corto y largo plazo. Por lo tanto, un chocolate con alto contenido de cacao tendrá mayor capacidad antioxidante.

Se estima que, en el Perú, el consumo per cápita de chocolate es de 500 g, pero el término chocolate en nuestro país engloba un universo muy grande y abarca desde los chocolates negros hasta los chocolates comerciales, los cuales muchas veces no especifican los porcentajes de cacao que llevan entre sus ingredientes. De este universo de chocolates, el consumidor nacional prefiere el chocolate comercial porque es más dulce, sin embargo, este chocolate estaría aportando los compuestos antioxidantes a la dieta del que lo consume.

De este interrogante, nace el interés por investigar si dichos chocolates presentan algún grado de capacidad antioxidante; para esto se tomaron chocolates comerciales con menor de 45% de cacao y chocolates que no especifican el contenido de cacao, planteándose en la investigación los siguientes objetivos:

- Cuantificar el contenido de grasa y polifenoles totales en chocolates comerciales.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los chocolates comerciales mediante la capacidad de inhibir los radicales 1,1-difenil-2-picilhidrazil (DPPH) y 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS+).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Cacao

2.1.1. Origen y distribución geográfica

Según WAIZEL – HAIAT *et al.* (2012) no se conoce con certeza el origen del cacao debido a la dificultad de encontrar a los ancestros silvestres, pero se propone que su diseminación comenzó en las tierras tropicales de América del sur, extendiéndose poco a poco hasta llegar al sureste de México, otros opinan que ocurrió lo opuesto, que se extendió desde el sureste de México o América Central, con los mayas, hasta la cuenca del río Amazonas.

2.1.2. Clasificación taxonómica

Según AGUIRRE (2017) *Theobroma cacao* L., se clasifica como:

Reino: Plantae

División: Espermatofita

Clase: Angiosperma

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae

Género: *Theobroma*

Especie: cacao

Nombre científico: *Theobroma cacao* L.

2.1.3. Composición química del grano de cacao

Las semillas de cacao contienen lípidos, carbohidratos y una mezcla compleja de compuestos químicos activos, metilxantinas teobromina, cafeína, trigonelina, teofilina, etc. (TROGNITZ *et al.*, 2013).

Los datos químicos para semillas secas dan un rango de 6-18% de polifenoles, compuestos principalmente de flavanoles; alrededor del 10% de los polifenoles totales está compuesto de monómeros como flavanol-3-oles (aproximadamente 3,5%) (-) - epicatequina y (+) - catequina, y el 90% restante está compuesto de oligómeros y polímeros; las procianidinas oligoméricas, que junto con las catequinas parecen ser las moléculas más activas, incluyen las procianidinas B1, B2, B5 y C1; otros flavonoles relevantes son las antocianinas y los glucósidos de flavonol incluidos los glucósidos de quercetina, etcétera (RIMBACH *et al.*, 2009).

2.1.4. Derivados del cacao

Según SÁNCHEZ *et al.* (2016), los derivados de cacao se definen como productos que se obtienen por extracción, prensado, o pulverización, y que pueden ser tratados químicamente y mezclados o no con azúcares u otros ingredientes. Los granos derivados de cacao son procesados artesanal o industrialmente, hasta obtener y productos finales. Las almendras son sometidas a un proceso de fermentación (no siempre) y posterior limpieza, tostado, descascarillado y trituración, para transformarla en pasta de cacao. Luego, tras el prensado, se convierten en manteca (parte líquida del proceso) y torta (parte sólida). Esta última una vez molida y cernida se transforma en polvo

de cacao, base para la preparación de las tabletas y bombones (QUINTERO, 2016).

- **Pasta de cacao.** Es el producto de la molienda de los trozos de cacao tostado, la grasa del interior de las células se libera y cubre las partículas de cacao, esto genera un líquido viscoso. La finura depende del producto al que se destine, generalmente las partículas deben ser menor a 30 μm (AFOAKWA, 2016).

- **Manteca de cacao.** La manteca de cacao con fines alimenticios es obtenida de los nibs de cacao antes o después de ser tostados mediante un proceso de prensado hidráulico o expeler (JACOME, 2015). La manteca de cacao es considerada el producto de mayor importancia de los subproductos del cacao, debido a las propiedades funcionales que son de gran importancia en la industria alimentaria (VILLEGAS *et al.*, 2016).

- **Cacao en polvo.** La torta puede ser pulverizada y convertirse en polvo de cacao. El cacao en polvo se usa básicamente para dar sabor a galletas, helados, bebidas y tortas, de igual manera se emplea en la producción de coberturas para confitería y en postres congelados (QUEVEDO, 2016).

2.2. chocolate

2.2.1. Breve historia del chocolate

Ya entre los años 600 y 1500 d.C., los mayas y los aztecas preparaban una bebida que la tomaba la clase alta: el “cacáhuatl” (o “chocólatl” según algunos autores), palabra que se traduce como agua de cacao. Primero preparaban la pasta de cacao tostando y moliendo los granos. Luego esto se

mezclaba con agua y la condimentaban con diferentes especias como: vainilla, pimienta, semillas de zapote, chile, achiote, miel, y algunas flores secas para mejorar su sabor. También la mezclaban con maíz molido para espesar la bebida. Con el descubrimiento de América en 1492 y la posterior invasión española a principios del 1500, la bebida del chocolate se abrió al mundo (COE *et al.*, 1999).

En 1842, el inglés John Cadbury fabrica por primera vez el chocolate para comer, ya que la mayor parte se venía haciendo para beber. Para lograrlo, al cacao le añadió vainilla y azúcar, consiguiendo un producto muy comercial y exquisito. Un compatriota suyo, Joseph Frey, crea un nuevo producto, la manteca de cacao, y logra el primer chocolate en tableta, que además de manteca de cacao contenía azúcar y pasta. Fue la primera tableta o barra de chocolate. En la década de 1880, se fue popularizando la tablilla de chocolate con leche. La adición de leche eliminaba el sabor ácido que el chocolate tenía hasta entonces. Este logro permitió la difusión definitiva del chocolate en Europa (SEVILLA, 2007).

2.2.2. Definición de chocolate

Chocolate es el nombre genérico de los productos homogéneos que se obtiene por un proceso adecuado de fabricación a partir de materias de cacao que pueden combinarse con productos lácteos, azúcares y/o edulcorantes, y otros aditivos. Para constituir distintos productos de chocolate pueden añadirse otros productos alimenticios comestibles, excluidos la harina y el almidón añadidos y grasas animales distintas de la materia grasa de la leche.

Las adiciones en combinación se limitarán al 40% del peso total del producto terminado. La adición de grasas vegetales distintas de la manteca de cacao no deberá exceder del 5% del producto terminado, tras deducir el peso total de cualquier otro producto alimenticio comestible añadido, sin reducir el contenido mínimo de las materias de cacao (NTP-CODEX STAN 87:2017).

Se define como una suspensión semisólida de partículas sólidas muy finas de azúcar y cacao, dispersas en una fase continua de grasa. El producto obtenido por la mezcla íntima y homogénea de cantidades variables de cacao en polvo o pasta de cacao y azúcar finamente pulverizada, con o sin adición de manteca de cacao, con un contenido del 35% de componentes del cacao, como mínimo. El contenido de cacao seco desengrasado no debe ser inferior al 14%, ni el de manteca de cacao inferior al 18%, todo ello expresado sobre materia seca (TORRES, 2012).

Se conoce como chocolate al producto homogéneo elaborado a partir de la mezcla de dos o más de los siguientes ingredientes: pasta de cacao, manteca de cacao, adicionado de azúcares u edulcorantes, así como otros ingredientes opcionales (JASSO, 2014).

2.2.3. Ingredientes del chocolate

- **Pasta de cacao:** es el ingrediente responsable del sabor, el color y la personalidad de un chocolate. Licor de cacao quizás es la descripción más ampliamente utilizada alrededor del mundo, pero otros sinónimos están en uso incluyendo pasta de chocolate, masa de cacao y pasta de cacao. Uso de la palabra "licor" no se relaciona con ningún contenido de alcohol. De hecho, el

término se refiere simplemente al cacao de naturaleza fluida del licor a temperaturas sobre el punto de fusión de la manteca de cacao. La Influencia de la pasta de cacao en el sabor, el color y la calidad del chocolate depende de cuatro muy distintos e igualmente importantes factores: El origen, la variedad, la calidad del grano de cacao y el desarrollo del precursor del sabor en los granos durante la fermentación y el secado (ADM, 2009). La pasta de cacao es la suspensión de partículas sólidas de cacao en manteca de cacao (GASTALVER, 2015).

- **Manteca de cacao:** La manteca de cacao es la grasa natural en los granos de cacao. Se extrae de la pasta de chocolate presionando y generalmente se filtra y se desodoriza antes de su uso. La mayoría del chocolate contiene no solo la manteca de cacao presente en la pasta de chocolate sino también la manteca de cacao adicional. La función de la manteca de cacao en el chocolate es suspender y lubricar las partículas de cacao y azúcar. La manteca de cacao reduce la viscosidad del chocolate derretido, pero no contribuye por sí misma de forma significativa al sabor del chocolate, ya que tiene poco sabor propio. La manteca de cacao posee cualidades únicas que la hacen una grasa muy deseable: La manteca de cacao tiene un estrecho rango de fusión justo por debajo de la temperatura normal del cuerpo humano. Eso tiende a permanecer duro hasta que está muy cerca de la temperatura corporal, y luego se derrite rápidamente, llevando y liberando sabores en el paladar. La manteca de cacao se solidifica a una consistencia frágil a temperatura ambiente normal (GREWELING, 2012). La manteca de cacao es la única constante, ya que está presente en la fase grasa, sea cual

sea el tipo de chocolate (GARTI y WIDLAK, 2015). Según KADIVAR *et al.*, (2015) es la fase continua responsables del brillo, textura y comportamiento de fusión típico del chocolate.

- **Azúcar:** es generalmente el segundo ingrediente más frecuente en el chocolate negro y constituye una parte aún más sustancial de muchos chocolates con leche y blancos. Su propósito es simplemente proporcionar dulzura al cacao amargo. Aunque las regulaciones de la FDA permiten el uso de cualquier edulcorante nutritivo de carbohidratos en la fabricación de chocolate, la sacarosa cristalina de la caña de azúcar o remolacha azucarera es el azúcar más usado en el chocolate. El azúcar en el chocolate no se disuelve, sino que se refina a partículas muy pequeñas para crear una sensación suave en la boca. El azúcar cristalino puede pulverizarse antes de mezclarse con el lote o puede refinarse completamente junto con la pasta de chocolate. De cualquier manera, el tamaño de partícula debe reducirse a menos de 25 micras para que el chocolate se sienta suave en la boca (GREWELING, 2012).

- **Leche:** Los sólidos lácteos agregados como leche en polvo desnatada o leche entera en polvo contribuyen al sabor, la textura y las propiedades reológicas. La leche contiene aproximadamente 5% de lactosa, 5% de grasa de leche, 3,5% de proteína y 0,7% de minerales. Los triglicéridos de la leche con predominio de ácidos grasos saturados, exhiben una estructura cristalina diferente a las de la manteca de cacao, en ella están presentes cantidades importantes de ácido palmítico, esteárico y oleico. La grasa de la leche es principalmente líquida (15-20% sólida) a temperatura ambiente, y

suaviza la textura del chocolate, inhibe floración de grasa. La grasa de la leche es propensa a la oxidación e influye en la vida útil. Las proteínas lácteas se agregan a la cremosidad percibida del chocolate con leche, la fracción de caseína actúa como surfactante y reduce la viscosidad del chocolate; las proteínas de suero de leche, por el contrario, aumentan la viscosidad (AFOAKWA, 2016).

- **Emulsionantes:** Son una clase de aditivos alimentarios utilizados en la producción de chocolate que tienen gran importancia en la calidad del producto. Algunos emulsionantes se usan en formulaciones de chocolate como mejoradores de propiedades reológicas que actúan como agentes de superficie activa CEBALLOS (2016) Se afirma que adiciones de 0,1% a 0,3% de lecitina de soya reducen la viscosidad de la manteca de cacao en más de 10 veces su mismo peso (BECKETT, 2015). Emulsificantes alternativos como el polirricinoleato de poliglicerol favorece el proceso productivo y previene la pérdida del Brillo durante el almacenamiento (FAJARDO y HARTEL, 2011).

2.2.4. Composición química del chocolate

Según BECKETT (2015), el contenido de proteína, carbohidratos, grasa, micronutrientes, minerales y vitaminas varía según el tipo de chocolate, una barra de 100 g de chocolate normal puede suministrar el 24% del cobre necesario para una dieta saludable, mientras que la leche y el chocolate blanco son una fuente relativamente buena de calcio, que se considera beneficioso para mantener los huesos fuertes. Los valores nutricionales típicos de estos

componentes para los diferentes tipos de chocolate se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Contenido promedio de 100 g de chocolate.

	Negro	Con leche	Blanco
Energía (kcal)	530	518	553
Proteína (g)	5	7	9
Carbohidratos(g)	55	57	58
Grasa (g)	32	33	33
Calcio (mg)	32	224	272
Magnesio (mg)	90	59	27
Hierro (mg)	3	2	0,2

Fuente: BECKETT (2015).

Según RAFECAS y CODONY (2000), los componentes del chocolate son los siguientes:

- **Energía:** el chocolate presenta un aporte energético de 90-94 Kcal/ración.

- **Proteína:** Los aportes de proteína de los diferentes derivados del cacao son bajos y muy similares y van de 0,9 a 1,4 g/ración. Los chocolates blancos y con leche presentan cifras algo superiores, debido a la presencia de sólidos lácteos como ingredientes en su fórmula. Hay que señalar que esta proteína no es de alto valor biológico, como en la mayor parte de las de origen vegetal, debido a su déficit en algunos aminoácidos esenciales.

- **Grasa:** La manteca de cacao es la grasa de las semillas de cacao, es responsable de las propiedades de fusión del chocolate y representa entre el 50 y 57% en peso seco del grano de cacao (STEINBERG *et al.*, 2003). Los ácidos grasos en manteca de cacao son palmítico (C16:0) 26 - 31%, esteárico (C18:0) 29 - 34%, oleico (C18:1) 31 - 35% y linoleico (C18:2) 0.8 - 5% (RIAÑO *et al.*, 2016).

- **Hidratos de carbono:** Estos son muy importantes ya que representan aproximadamente la mitad del peso de chocolate normal. La mayoría de esto es sacarosa, pero también hay lactosa en la leche en polvo, o puede agregarse como ingrediente. A veces, pequeñas cantidades de glucosa están presentes para reducir la dulzura. La fructosa ahora se usa en menor medida debido a sus posibles efectos negativos para la salud. Pequeñas cantidades de otros carbohidratos están presentes como fibra dietética del cacao (BECKETT, 2015).

2.2.5. Tipos de chocolate

Según la NTP-CODEX STAN 87 (2017) los diferentes tipos de chocolate y sus requisitos para su denominación (Cuadro 2 y 3) las mismas que se detallan a continuación:

- **Chocolate:** También llamado chocolate negro, amargo o sin leche. Debe contener un mínimo de 34% de cacao puro, aunque cuanto mayor es la proporción de cacao mejor es el chocolate. Para este tipo de chocolate el mínimo exigido de cacao es de 60%, de manera que el chocolate negro de alta calidad se caracteriza por su bajo contenido de azúcar (JARRÍN, 2010).

Cuadro 2. Tipos y requisitos de chocolates por su forma

Productos	Componentes (%)						
	Tipos de chocolates	manteca de cacao	Extracto seco magro de cacao	Total de extracto seco de cacao	Materia grasa de la leche	Total de extracto seco magro de la leche	Almidón / harina
Chocolate en granos/ copos/ ojuelas	≥ 12	≥ 14	≥ 32	-	-	-	-
Chocolate con leche en granos/ copos/ hojuelas	-	≥ 2,5	≥ 20	≥ 3	≥ 12	-	-
Chocolate relleno	La parte de chocolate del revestimiento debe representar al menos el 25% del peso total del producto en cuestión.						
Bombones de chocolate	Se denominan bombones de chocolate los productos del tamaño de un bocado en los cuales la cantidad del componente de chocolate no deberá ser inferior al 25% del peso total del producto.						

Fuente: NTP-CODEX STAN 87:2017)

Cuadro 3. Tipos y requisitos de chocolates por su composición

Productos	Componentes (%)						
	manteca de cacao	Extracto seco magro de cacao	Total de extracto seco de cacao	Materia grasa de la leche	Total de extracto seco magro de la leche	Almidón / harina	Avellanas
Chocolate	≥ 18	≥ 14	≥ 35	-	-	-	-
Chocolate a la taza	≥ 18	≥ 14	≥ 35	-	-	< 8	-
Chocolate dulce familiar	≥ 18	≥ 12	≥ 30	-	-	-	-
Chocolate fam. a la taza	≥ 18	≥ 12	≥ 30	-	-	< 18	-
Chocolate de cobertura	≥ 31	≥ 2,5	≥ 35	-	-	-	-
Chocolate / leche	-	≥ 2,5	≥ 25	2,5-3,5	12-14	-	-
Chocolate / leche fam.	-	≥ 2,5	≥ 20	≥ 5	≥ 20	-	-
Chocolate de cobertura con leche	-	≥ 2,5	≥ 25	≥ 3,5	≥ 14	-	-
Chocolate blanco	≥ 20	-	-	2,5 – 3,5	≥ 14	-	-
Chocolate Gianduja	-	≥ 8	≥ 32	-	-	-	≥ 20 ≤ 40
Chocolate gianduja /leche	-	≥ 2,5	≥ 25	2,5 – 3,5	≥ 10	-	≥ 15 ≤ 40
Chocolate para mesa	≥ 11	≥ 9	≥ 20	-	-	-	-
Chocolate semiamargo mesa	≥ 15	≥ 14	≥ 30	-	-	-	-
Chocolate amargo/mesa	≥ 22	≥ 18	≥ 32	-	-	-	-
Chocolate relleno	La parte de chocolate del revestimiento debe representar al menos el 25% del peso total del producto en cuestión.						
Bombones de chocolate	Se denominan bombones de chocolate los productos del tamaño de un bocado en los cuales la cantidad del componente de chocolate no deberá ser inferior al 25% del peso total del producto.						

Fuente: (NTP-CODEX STAN 87:2017)

- **Chocolate a la taza:** Es un chocolate negro el cual contiene un máximo del 8% m/m de harina y/o almidón de trigo, maíz o arroz (NTP-CODEX STAN 87, 2017).

- **Chocolate dulce familiar:** El chocolate dulce/familiar deberá contener, no menos del 30% de extracto seco total de cacao, del cual no menos del 18% será manteca de cacao y el 12% , por lo menos, extracto seco magro de cacao (GASTALVER, 2015).

- **Chocolate familiar a la taza:** Es un chocolate dulce familiar que contiene un máximo del 18 % m/m de harina y/o almidón de trigo, maíz o arroz (NTP-CODEX STAN 87, 2017).

- **Chocolate de cobertura:** Es aquel que contiene un mínimo de 31% de manteca de cacao, esta composición de manteca de cacao le transfiere una textura para poder moldear y obtener piezas de decoración (GONZALES y REY, 2017).

- **Chocolate con leche:** Se puede considerar prácticamente un dulce, porque la proporción de pasta de cacao que contiene suele ser inferior al 40%. El chocolate con leche, como su propio nombre indica, lleva leche añadida en polvo o condensada (MONTILLA, 2015).

- **Chocolate con leche familiar:** En extracto seco, no menos del 20% de extracto seco de cacao (incluido un mínimo del 2,5% de extracto magro de cacao) y no menos del 20% de extracto seco de leche, (incluido un mínimo del 5% de grasa de leche). El extracto seco de leche se refiere a la adición de ingredientes lácteos en sus proporciones naturales, salvo que la grasa de leche podrá agregarse o eliminarse (GASTALVER, 2015).

- **Chocolate de cobertura con leche:** El chocolate de cobertura con leche contendrá, en base a materia seca, no menos del 25% de extracto seco de cacao (incluido un mínimo del 2,5% de extracto magro de cacao) y no menos del 14% de extracto seco de leche (incluido un mínimo del 3,5% de grasa de leche) y un total de grasa no inferior al 31%. El extracto seco de leche se refiere a la adición de ingredientes lácteos en sus proporciones naturales, salvo que la grasa de leche podrá agregarse o eliminarse (NTP-CODEX STAN 87, 2017).

- **Chocolate blanco:** Es aquel que no utiliza la pasta de cacao en su fabricación sino solamente la manteca de cacao combinada con azúcar en polvo y leche. Es un chocolate que se funde con facilidad al contacto con la lengua (CASTILLO y MEZA, 2013).

- **Chocolate gianduja:** El chocolate gianduja (o uno de los derivados del nombre "Gianduja") es el producto obtenido, en primer lugar, de chocolate con un contenido mínimo total de extracto seco de cacao del 32%, incluido un contenido mínimo de extracto seco desgrasado de cacao del 8% y, en segundo lugar, de sémola fina de avellana en unas proporciones por las cuales el producto contenga al menos 20% y no más del 40% de avellanas (BECKETT *et al.*, 2017).

- **Chocolate gianduja con leche:** es el producto obtenido, en primer lugar, de chocolate con leche con un contenido mínimo de extracto seco deshidratado de leche del 10% y, en segundo lugar, de sémola fina de avellana mezcladas en cantidades que contenga al menos el 15% y no más del 40% de

avellanas. El extracto seco de leche se refiere a la adición de ingredientes lácteos en sus proporciones naturales (NTP-CODEX STAN 87, 2017).

- **Chocolate para mesa:** El chocolate para mesa es chocolate sin refinar en el cual el tamaño de grano de los azúcares es más grande que 70 µm. Debe contener, en términos de materia seca, no menos del 20% total de sólidos de cacao incluyendo un mínimo de 11% de manteca de cacao y un mínimo de 9% de sólidos de cacao sin grasa (BECKETT *et al.*, 2017).

- **Chocolate semiamargo para mesa:** Deberá contener, en relación con el extracto seco, no menos del 30% de extracto seco de cacao (incluido un mínimo del 15% de manteca de cacao y del 14% de extracto seco magro de cacao) (CODEX STAN 87-1981, 2016).

- **Chocolate amargo para mesa:** deberá contener, en relación con el extracto seco, no menos del 40% de extracto seco de cacao (incluido un mínimo del 22% de manteca de cacao y del 18% de extracto seco magro de cacao) (NTP-CODEX STAN 87, 2017).

- **Uso del término chocolate:** Los productos que no se definen en los Cuadros 2 y 3 podrán incluir en sus denominaciones el término “chocolate” en caso de que su sabor de chocolate derive únicamente del extracto seco magro de cacao, según las disposiciones o las costumbres del país en que el producto se venda, y con el objeto de designar otros productos que no pueden confundirse con los que se definen en la presente Norma (NTP-CODEX STAN 87:2017).

2.2.6. Proceso de la elaboración del chocolate

Según CEBALLOS (2016), la producción del chocolate consta de etapas bien definidas. Durante las primeras etapas, el chocolate es un fluido y se lo prepara para convertirlo controladamente en un sólido. El elemento central de este comportamiento es su fase continua grasa (manteca de cacao). En ella se dispersan sólidos (sólidos de cacao y azúcar) para formar una suspensión que es y debe mantenerse libre de agua; y que luego debe ser estabilizada. Independientemente de diferencias puntuales que tienen origen en las zonas geográficas donde se fabrique y en las costumbres de consumo de las poblaciones que habitan esas regiones.

- **Mezcla:** El objetivo de esta operación es la obtención de una masa homogénea, en la cual se recubren todas las partículas con grasa. Cuando se adiciona una cantidad excesiva de grasa, la refinadora absorbe primero la grasa y más tarde los sólidos secos, si por el contrario se agrega poca grasa, se produce un sobrecalentamiento debido a la fricción excesiva y se obtiene un producto poco firme (JARRÍN, 2010).

- **Refinación:** La refinación del chocolate se realiza con el fin de obtener una masa con el tamaño de partícula apropiado. Generalmente se emplea una refinadora de cinco rodillos, los cuales están enfriados con agua y tienen una superficie convexa, cada rodillo gira con más rapidez que el anterior y va recogiendo la masa y pasándola al siguiente rodillo (DESROSIER, 1997).

- **Conchado:** Este es básicamente un paso de mezclado exhaustivo de los ingredientes del chocolate con producción de cambios no sólo físicos sino también químicos, que incluyen el desarrollo de sabores y

aromas definitivos, así como la transformación de la masa grosera de chocolate refinado en una suspensión fluida totalmente homogénea. En esta suspensión donde la manteca de cacao es la fase continua, cada una de las partículas sólidas se dispersará para terminar por recubrirse con una capa de grasa (CEBALLOS, 2016). La etapa de conchado se basa en la agitación de la masa de chocolate y generalmente se da a una temperatura de 50 °C. El conchado ocurre en tres etapas: etapa seca, plástica y líquida. En la etapa seca se reduce de manera significativa el contenido de humedad de un 1,5% a un 0,6-0,8% aproximadamente, adicionalmente, se eliminan compuestos indeseables como ácidos, aldehídos y cetonas. En la etapa plástica se produce un efecto de cizallamiento de la masa del chocolate, con el fin de garantizar la humectación de las partículas de azúcar, desarrollo del aroma y un cambio en la plasticidad de la masa de cacao. Por último se encuentra la etapa líquida, donde se adiciona la grasa faltante según la fórmula y un emulsionante para obtener la viscosidad deseada según el tipo de chocolate, también pueden agregarse las esencias líquidas y se homogeniza hasta incorporar el resto de ingredientes (TOBERGTE y CURTIS, 2013).

- **Templado:** El propósito de templar el chocolate es recristalizar de manera estable la manteca del cacao presente en el chocolate. La manteca de cacao es caprichosa y una vez fundida, no logra alcanzar por sí misma una forma cristalina estable. Por eso, es necesario hacer pasar al chocolate por un ciclo de temperaturas (la denominada curva de atemperado) que hace que la manteca, el único elemento del chocolate que cambia el estado durante el fundido, vuelva a ser estable al endurecerse (MANGAS, 2015).

- **Moldeo:** En este proceso se vierte la masa líquida de cacao en moldes, además es el momento de añadir los componentes que vaya a llevar. Los moldes pueden rellenarse a mano a una temperatura de 31 a 33 °C; en ésta etapa el chocolate está espeso y pastoso, por esto, se somete a agitación o vibración vigorosa para asegurar que el chocolate esté en contacto total con el molde y para expulsar las burbujas del aire que aparecen en las superficies (RUIZ y SORIANO, 2014).

- **Envasado:** Los productos finales son llevados por un transportador a las máquinas de embalaje y son envueltos en papel de aluminio, luego se realiza el envasado individual y se meten los productos en cajas (RUIZ y SORIANO, 2014).

2.3. Polifenoles

2.3.1. Definición

Según QUIÑONES *et al.* (2012), los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos en la naturaleza, algunos alimentos sabemos que destacan por su alto contenido en polifenoles que se definen en función de número de anillos fenólicos; los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides.

PEREDA (2011) indica que los polifenoles son sustancias complejas que derivan del fenol. Ésta es una sustancia que lleva un grupo –OH unido a un anillo aromático de seis carbonos; es una sustancia muy importante en la química. Los polifenoles están formados normalmente por condensación

de varios de esos anillos fenólicos y pueden llevar incorporados en algunos de sus carbonos otras sustancias. Se producen en el metabolismo secundario de las plantas y están asociadas a las propiedades de astringencia y amargor. Los polifenoles se producen en pequeñas concentraciones en los tejidos y se acumulan en ellos protegiendo a las plantas de la luz ultravioleta y de los ataques de ciertos hongos y pueden sintetizarse más en situaciones de estrés. Los polifenoles tienen también propiedades de control de microorganismos por medio de mecanismo aun no muy bien aclarados.

- **Ácidos fenólicos:** Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen los derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico. Los ácidos fenólicos están ampliamente distribuidos en las frutas; en muchas de ellas contribuyen al color y sabor. Son responsables de la astringencia de muchas de ellas, si bien en la mayoría desaparecen con la maduración (GIL, 2010).

- **Estilbenos:** Son compuestos fenólicos de bajo peso molecular que se localizan de manera específica como compuestos bióticos inducidos o fitoalexinas en tejidos de plantas no lignificadas y de manera general como resultado de síntesis constitutiva en tejidos lignificados. Los compuestos estilbenos actúan como compuestos antifúngicos, lo cual permite a la planta superar un ataque por patógenos (MARTÍNEZ, 2016).

- **Lignanós:** Son un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios de las plantas, formados principalmente por unidades de fenilpropanoides. Estos compuestos se encuentran en los cereales (particularmente, el centeno), vegetales, frutas, principalmente en las bayas, al igual que en el café, el té y el

vino. Los lignanos de los cereales son la principal fuente de fitoestrógenos en occidente, mientras que en oriente son las isoflavonas de la soja (GIL, 2010).

- **Alcoholes fenólicos:** Son los que contienen la función alcohol y la función fenol, como el alcohol coniferilico, el alcohol sinapilico y el alcohol p-cumarilico, intervienen en la formación de los ligninos. Los ligninos son sustancias poliméricas muy complejas que junto a la celulosa, forma parte de los troncos y las ramas de los árboles y arbustos (ACUÑA, 2006).

- **Flavonoides:** Engloba a numerosos componentes naturales repartidos en varias familias, siendo los más importantes las flavonas y las isoflavonas. Se trata de pigmentos naturales que le dan color a las plantas. Los encontramos en plantas muy coloridas como las verduras de color verde oscura o las frutas rojas. Los flavonoides, por su gusto desagradable, pueden repeler a determinados insectos y proteger a la planta. Las propiedades y efectos de los flavonoides en el ser humano son cada vez más conocidos. Se les reconoce muchas de las funciones de los antioxidantes, pero también propiedades antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas (CAUSSE, 2010).

2.3.2. Polifenoles presentes en el grano de cacao

LLOPART *et al.* (2018) afirma que los polifenoles ejercen una importante influencia sobre la salud humana, principalmente por su capacidad antioxidante. Según LOPEZ *et al.* (2016), algunos polifenoles identificados en semillas de cacao y subproductos son catequinas, flavonoides, antocianinas y procianidinas. La cantidad total de polifenoles solubles (porcentaje de masa seca, libre de grasa) presentes en las semillas de cacao frescas, puede variar

entre 15 y 20%, pero en las fermentadas esta concentración se reduce hasta un 5% (CASTRO *et al.*, 2016).

Según VALENZUELA (2007), los flavonoides que se encuentran en alta concentración en el cacao y por consiguiente en el chocolate, son los llamados flavanoles. Los flavanoles del cacao se presentan en dos formas estructurales, como entidades únicas o monómeros, o como estructuras oligoméricas (polímeros). Dentro de los flavanoles monómeros más importantes que se encuentran en el cacao y en sus subproductos, están la (-)-epicatequina y la (+)-catequina, y entre los productos poliméricos, las procianidinas. Estas últimas moléculas se presentan con diferente grado de polimerización en el cacao y sus subproductos. Se les encuentra como dímeros (2 unidades), trímeros (3 unidades), tetrámeros (4 unidades), hasta decámeros (10 unidades). La estructura química de los flavanoles monoméricos (-)-epicatequina y (+)-catequina son estructuras prácticamente iguales, aunque la posición en el plano espacial del grupo -OH en el segundo anillo es diferente. En la (-)-epicatequina se encuentra hacia atrás y en la (+)-catequina, hacia adelante del plano que forma la molécula.

2.4. Antioxidantes

2.4.1. Definición

Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares. Se han

clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y no enzimático. Cuando estos sistemas antioxidantes fracasan se produce un exceso de radicales libres (LÓPEZ *et al.*, 2012). Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (CORONADO *et al.*, 2015).

2.4.2. Tipos de antioxidantes

- **Antioxidantes enzimáticos:** Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar por diferentes mecanismos a las ERO, como es el caso de la superóxidodismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otras (HICKS *et al.*, 2006).

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

2.4.3. Efectos antioxidantes del chocolate

Según DILLINGER (2000), el consumo de cacao inicialmente y de chocolate, posteriormente, siempre se asoció con beneficios para la salud,

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

La capacidad antioxidante del chocolate puede verse afectada por diferentes procesos industriales; las diferentes etapas en el proceso de industrialización de los granos de cacao son: fermentación, secado, tostado, molienda, prensado, mezclado, refinado, conchado, atemperado y moldeo (AFOAKWA *et al.*, 2007). Existen dos etapas principalmente donde se evidencian mayores cambios de dichos compuestos, el tostado y el conchado. En el tostado se puede presentar un aumento de la temperatura por encima de 130 °C, lo que reduce significativamente el nivel de polifenoles en los granos de cacao (DI MATTIA *et al.*, 2017).

2.5. Radicales libres y el chocolate

Los radicales libres son especies químicas que contienen un electrón desapareado en su orbital externo confiriéndoles inestabilidad con un alto poder oxidante o reductor, haciéndolos reaccionar con otras moléculas

para lograr estabilidad química; como consecuencia, dichas moléculas sufren alteración en su composición, estructura o función (MONDRAGÓN-TERÁN *et al.*, 2014).

Los radicales libres están involucrados en funciones bien definidas a través de las reacciones oxidación-reducción, modificando una gran diversidad de moléculas que participan en la mayoría de las vías de señalización celular, o bien, moléculas de la matriz extracelular. La producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo (LÓPEZ *et al.*, 2012)

El proceso de óxido-reducción celular desempeña funciones importantes en la fisiología celular; sin embargo, su desequilibrio genera radicales libres y especies reactivas de oxígeno. La alteración del proceso de óxido-reducción se denomina "estrés oxidativo", que induce disfunción endotelial. La contaminación ambiental y otros estímulos son inductores de estrés oxidativo y disfunción endotelial, que provocan algún estado inflamatorio crónico relacionado con al menos 100 enfermedades (diabetes obesidad, hipertensión arterial, Alzheimer y procesos fisiológicos como el envejecimiento). Los mecanismos antioxidantes celulares suelen afectarse en ciertas ocasiones; no obstante, la alimentación puede complementarlos con una gran variedad de sus compuestos activos (polifenoles) contenidos en frutas, verduras, especias aromáticas y granos, principalmente el cacao y el chocolate oscuro. Los polifenoles de la dieta, previa interacción con la microbiota intestinal, pueden modular la respuesta inflamatoria endotelial, mejorar la biogénesis mitocondrial e incrementar la captación de glucosa. También tienen la capacidad de evitar o

retardar la aparición de enfermedades, por lo que resulta interesante combinar una dieta con los diferentes polifenoles, con la esperanza que nos libre de una polifarmacia (MICHEL-ACEVES *et al.*, 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (CIPNA) y el Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico de la Amazonia (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09° 17'08" de Latitud Sur, a 75° 59'52" de Latitud Oeste ,con clima tropical húmedo, humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24°C.

3.2. Muestras

Se realizó encuestas en tiendas comerciales minoristas de la ciudad de Tingo María sobre la preferencia de chocolates obteniéndose 4 marcas los más consumidos. A estos se sumaron 6 chocolates con leche producidos en la región de San Martín y 1 de pasta de cacao (testigo) obteniéndose 11 muestras. Se adquirieron 3 lotes diferentes por cada muestra, en intervalos de 15 días. Las muestras se recabaron en los mercados de la ciudad de Tingo María y Tarapoto. Los ingredientes fueron tomados de las etiquetas las cuales se muestran en el Cuadro 1, todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta la realización del análisis.

Cuadro 4. Descripción de las muestras de chocolates comerciales

Muestra	Marca	Empresa productora	Ubicación de la fabrica	Porcentaje de cacao	Ingredientes
M1	Triángulo D'Onofrio	Nestlé Perú S.A./AG	Av. Venezuela 2580, (altura cdra. 25 Av. Venezuela) ,Lima, Lima, Lima	No especifica	Azúcar, leche entera, manteca de cacao, masa de cacao, grasa vegetal (palma y girasol), suero de leche, emulsiónate (lecitina de soya y esteres poligliceridos de ácido ricinoleico interestirificado), sal y saborizante.
M2	Fochis de leche,	Compañía Nacional De Chocolates De Perú S.A	Av. Maquinarias 2360, urb. Conde de las torres ,Lima, Lima, Lima	No especifica	Azúcar, leche entera, manteca de cacao, masa de cacao, grasa vegetal, emulsiónate, sal y saborizante.
M3	Milky	La ibérica S.A	Av. Juan Vidaurrazaga M 131, Z.I. Parque industrial ,Arequipa, Arequipa, Arequipa	38	Pasta de cacao, manteca de cacao, azúcar, leche en polvo y lecitina de soya.
M4	Orquídea con leche	Industria Mayo S.A	Jr. Santa Monica 200 , , Tarapoto, San Martin, San Martin	35	Azúcar, leche entera en polvo, manteca de cacao, pasta de cacao.
M5	Makao leche	Agroindustria Makao Perú S.A.C	Jr. Cuzco Nro. 402 , ,Pucacaca, Picota, San Martin	45	Pasta de cacao, manteca de cacao, azúcar, leche en polvo y lecitina de soya
M6	Sublime	Nestlé Perú S.A./AG	Av. Venezuela 2580, (Altura Cdra. 25 Av. Venezuela) , Lima, Lima, Lima	No especifica	Azúcar, maní, manteca de cacao, leche entera, masa de cacao, grasa vegetal (girasol), suero de leche, emulsiónate (lecitina de soya y esteres poligliceridos de ácido ricinoleico interestirificado), sal y saborizante.
M7	Fochis con pasas	Compañía Nacional de Chocolates de Perú S.A	Av. Maquinarias 2360, urb. Conde de las torres ,Lima, Lima, Lima	No especifica	Azúcar, pasas, manteca de cacao, masa de cacao, leche entera, grasa vegetal, sal y saborizante.
M8	Orquídea con leche y kiwicha	Industria Mayo S.A	Jr. Santa Monica 200 , , Tarapoto, San Martin, San Martin	35	Azúcar, leche entera en polvo, manteca de cacao, pasta de cacao, kiwicha, lecitina de soya.
M9	Orquídea con leche y pecana	Industria Mayo S.A	Jr. Santa Monica 200 , , Tarapoto, San Martin, San Martin	35	Azúcar, leche entera en polvo, manteca de cacao, pasta de cacao, pecanas tostadas y lecitina de soya.
M10	Exotic almendras	Exotic Chocolatier S.A.C.	Jr. Plaza mayor Nro. 195 , Tarapoto, San Martin, San Martin	35	Azúcar, leche entera en polvo, manteca de cacao, pasta de cacao, almendras y lecitina de soya.
M11	Comincacao	Comercial Industrial de cacao	Carr. Fernando Belaunde Terry KM. 1.5 , , Juanjui, Mariscal Cáceres, San Martin	100	Pasta de cacao

3.3. Materiales, equipos de laboratorio y reactivos

3.3.1. Materiales de laboratorio

Matraces de Erlenmeyer de 250 mL; vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1000 mL; pipetas graduadas de 5 y 10 mL; tubos de ensayo 10 mL; fioles de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 mL; probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 mL; Frascos ámbar de 100 mL; embudo; micropipetas 0-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL ; cubetas de poliestireno (1cm x 1cm x 4.5cm); tips, (1000 y 200 μL); microtubos (1,5 -2,00 mL); papel de filtro; pinzas; espátulas; gradillas y bolsas trilaminadas de 1 kg.

3.3.2. Equipos de laboratorio

Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation) SN 2M6G261002 EE.UU.; equipo Soxhlet modelo EV16 (Gerhardt), balanza analítica OHAUS modelo Pro AV114 capacidad 110 g \pm 0,2 mg EE.UU.; estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven) Alemania; estufa modelo 16 (THELCO) EEUU; congelador Frigidaire FFU-2065FW - 20°C Reino Unido; refrigerador LG GR-5392QLC Corea del Sur; Desionizador Barnstead modelo D 7035; Homogenizador VORTEX GENIE-2 UU.EE; Centrifuga MIKRO 22R EE.UU; empacadora multivac modelo A 300/16 Alemania.

3.3.3. Reactivos y solventes

Acido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) al 98,1% Sigma; folin–ciocalteu phenol reagent, 2N (Sigma-Aldrich); carbonato de Sodio (Na_2CO_3); metanol al 99% de

pureza; 1,1-Diphenyl-1-picril-hydrayl (DPPH; Sigma-Aldrich); 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline – 6 ácido sulfónico) diammonium salt (ABTS; Sigma- Aldrich); agua destilada desionizada (H₂O_{dd}); persulfato de Potasio (K₂S₂O₈) p.a. (Sigma Chemical), HEXANO (Merck KGaA)

3.4. Métodos de análisis

Determinación del contenido de grasa: Se realizó por extracción con hexano según método de Soxhlet. AOAC (1980). N°7.056.

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

Determinación de la capacidad antioxidante

- **Capacidad de inhibir radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH),** método espectrofotométrico de luz visible a 517 nm descrito por (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).
- **Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6-ácido sulfónico) (ABTS^{°+}),** método descrito por PELLIGRINI *et al.*, 1999).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Determinación del contenido de grasa en chocolates comerciales

Se envolvió 5 g de muestra de chocolate (M) previamente triturada en papel filtro N° 42 el cual se llevó a un equipo soxhelt durante ocho horas utilizando como solvente 150 ml de hexano, se ajustó la temperatura en el

equipo de tal manera que se obtuvo alrededor de 10 reflujos por hora logrando así una correcta extracción de la grasa de las muestras de chocolate. Los pesos de los balones de extracción del equipo soxhlet se registraron antes (m_1) y después de la extracción (m_2). Las muestras desengrasadas fueron envasadas y utilizadas en los posteriores análisis. El procedimiento se realizó por triplicado. El contenido de grasa se determinó por fórmula 1:

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{(m_2 - m_1)}{M} * 100 \dots\dots\dots(1)$$

Dónde:

m_1 : Peso del balón antes de la extracción.

m_2 : Peso del balón después de la extracción.

M: Peso de la muestra de chocolate triturada = 5 g

Los resultados de la cuantificación de grasa fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2018P. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

3.5.2. Preparación del extracto hidroalcohólico

Este extracto se preparó para la cuantificación de polifenoles totales y determinación de la actividad antioxidante de las muestras de chocolates comerciales, el procedimiento se describe a continuación: Las muestras desengrasadas fueron envasadas en bolsas de polietileno, selladas y forradas con papel aluminio; las bolsas con el contenido de las muestras desengrasadas se almacenaron en refrigeración previa rotulación. Se pesó 2 g

de muestra desengrasada y se enrazó hasta 20 mL de solución hidroalcohólica (50:50 v/v), teniendo una concentración de 100 mg/mL, el cual se transfirió a un frasco de vidrio color ámbar rotulado, fue sellado herméticamente y se dejó en maceración por 24 horas a temperatura ambiente, seguidamente cumplido el tiempo se filtró, centrifugó a 10000 rpm/10min/4°C y almacenó en congelación a -20°C hasta su análisis.

3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en chocolates comerciales

- 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: 1,00; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 y 0,05 mg/mL, cada dilución por triplicado. Se agregó a cada tubo 1,58 mL de agua desionizada y 20 µL de la solución stock y para el caso del blanco 20 µL de agua desionizada, se homogenizó ligeramente. Luego se agregó 100 µL de solución de fenol Folin-Ciocalteu a cada tubo, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente; se neutralizó la reacción agregando 300 µL de Na₂CO₃ 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.

- Cuantificación de polifenoles totales

Se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL, del que se tomaron las muestras realizando 3 repeticiones por tratamiento previa dilución a 10 mg/ml para la pasta de cacao Comincacao (M11), 25 mg/ml para los chocolates Milky (M3), Makao leche (M5) y fochis con pasas (M7); 100 mg/ml para Triangulo Donofrio (M1), Fochis de leche (M2), Orquídea con leche (M4), Sublime (M6), orquídea con leche/kiwicha (M8), orquídea leche/pecana (M9), Exotic con leche/almendras (M10) tal como se muestra en el Cuadro 5. La reacción se realizó adicionando en los tubos 1580 μ L de agua destilada, 20 μ L de la muestra preparada, 100 μ L de fenol Folin-Ciocalteu y finalmente 300 μ L de 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 un DCA utilizando el programa estadístico InfoStat version 2018P. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Cuadro 5. Concentraciones de trabajo para determinar polifenoles

Muestra	μ g de extracto (100 mg/mL)	μ g H ₂ O destilada	Volume n final	Concentración de trabajo [mg/mL]
M1, M2, M4, M6, M8, M9, M10	1000	0	1000	100
M3, M5, M7	250	750	1000	25
M11	100	900	1000	10

3.5.4. Determinación de la capacidad antioxidante en chocolates comerciales

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

Se preparó una solución stock de DPPH a 1 mM (0,004 g de DPPH en 10 ml de metanol 95%) y se almacenó a 4 °C. A partir de este stock se preparó 20 ml (100 µM DPPH) en metanol 95%,. Para la inhibición del radical DPPH se prepararon soluciones de trabajo a partir de los extractos hidroalcohólicos (100 mg/mL) de las distintas muestras de chocolates comerciales tal como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Concentraciones de trabajo para el radical DPPH.

Muestras	Concentraciones de trabajo (µg/ml)				
M1	80000	60000	30000	20000	10000
M2	80000	60000	30000	20000	10000
M3	40000	30000	20000	10000	5000
M4	80000	60000	30000	20000	10000
M5	20000	10000	8000	4000	3000
M6	80000	60000	30000	20000	10000
M7	40000	30000	20000	10000	5000
M8	80000	60000	30000	20000	10000
M9	80000	60000	30000	20000	10000
M10	100000	80000	60000	40000	20000
M11	4000	3000	2000	1000	500

En el Cuadro 7 se muestra las diluciones que se realizaron para lograr las diferentes soluciones de trabajo. En una cubeta de poliestileno se agregó 25 µl de solución de trabajo a 975 µl de solución de 100 µM DPPH, la inhibición de los radicales libres se determinó por la degradación del color violeta a amarillo, la cual fue leída en el espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 515 nm cada 30 segundos por 10 min; la capacidad de secuestro fue determinado por la fórmula 2:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(Ac - Am(t)) / Ac] \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

Dónde:

Ac : Absorbancia del control, DPPH (100 µM).

Am (t): Absorbancia de la muestra en función a tiempo (10 min).

A partir del porcentaje de inhibición se calculó IC₅₀ (cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%) para ello se graficaron los valores del porcentaje de inhibición en función a la concentración para cada solución de trabajo. Los resultados de la capacidad de inhibir (IC₅₀) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) utilizando el programa estadístico InfoStat version 2018P. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Cuadro 7. Volúmenes necesarios para la preparación de las diferentes concentraciones para determinar el IC₅₀ frente al radical DPPH

Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)	extracto		volumen final (μl)
	hidroalcohólico 100 mg/ml (μl)	solución hidroalcohólica (μl)	
100000	1000	0	1000
80000	800	200	1000
60000	600	400	1000
40000	400	600	1000
30000	300	700	1000
20000	200	800	1000
10000	100	900	1000
8000	80	920	1000
5000	50	950	1000
4000	40	960	1000
3000	30	970	1000
2000	20	980	1000
1000	20	1980	2000
500	20	3980	4000

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

Para esta prueba se preparó el radical ABTS^{o+} para ello se procedió a la reacción de ABTS^{o+} (7 mM) con persulfato potásico (140 mM) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas.

Una vez formado el radical $ABTS^{\circ+}$ se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia entre 0,7 a 1,2. Para la inhibición del radical $ABTS^{\circ+}$ se prepararon soluciones de trabajo a partir de los extractos hidroalcohólicos (100 mg/mL) de las distintas muestras de chocolates comerciales tal como se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Concentraciones de trabajo para el radical $ABTS^{\circ+}$ en chocolates comerciales.

Muestras	Concentraciones de trabajo ($\mu\text{g/ml}$)				
M1	100000	70000	40000	20000	10000
M2	100000	70000	40000	20000	10000
M3	50000	35000	20000	10000	5000
M4	100000	70000	40000	20000	10000
M5	30000	20000	10000	6000	3000
M6	100000	70000	40000	20000	10000
M7	50000	35000	20000	10000	5000
M8	100000	70000	40000	20000	10000
M9	100000	70000	40000	20000	10000
M10	100000	90000	80000	70000	60000
M11	5000	4000	3000	2000	1000

En el Cuadro 9 se muestra las diluciones que se realizaron para lograr las diferentes soluciones de trabajo.

Cuadro 9. Volúmenes necesarios para la preparación de las diferentes concentraciones para el coeficiente de inhibición (IC₅₀) para el radical ABTS.

Concentraciones (µg/ml)	Extracto hidroalcohólico 100 mg/ml (µl)	Solución hidroalcohólica (µl)	Volumen final (µl)
100000	1000	0	1000
90000	900	100	1000
80000	800	200	1000
70000	700	300	1000
60000	600	400	1000
50000	500	500	1000
40000	400	600	1000
35000	350	650	1000
30000	300	700	1000
20000	200	800	1000
10000	100	900	1000
6000	60	940	1000
5000	50	950	1000
4000	40	960	1000
3000	30	970	1000
2000	20	980	1000
1000	20	1980	2000

En una cubeta de poliestileno se agregó 10 µl de muestra y 990 µl del radical ABTS^{°+}. La inhibición de los radicales libres se determinó por la

degradación del color verde, la cual fue leída a 734 nm cada 30 segundos por 5 min. La capacidad de secuestro fue determinada por la Fórmula 3:

$$\% \text{ Inhibición ABTS}^{\circ+} = [(A_c - A_{m(t)}) / A_c] \times 100 \dots \dots \dots (3)$$

Dónde:

A_c : Absorbancia del control, ABTS^{°+}.

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

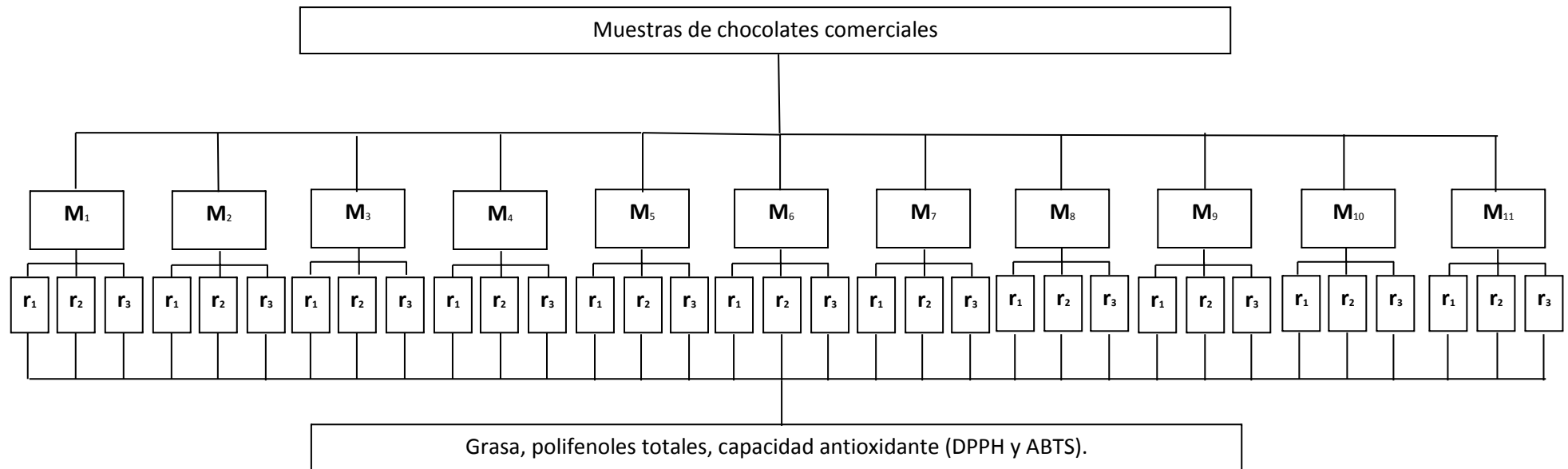
A partir del porcentaje de inhibición se calculó el IC₅₀ (µg/mL) para ello se graficaron los valores del porcentaje de inhibición en función a la concentración para cada extracto obteniendo así la ecuación de la gráfica.

Los resultados de la capacidad de inhibir (IC₅₀) del radical ABTS^{°+} fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) utilizando el programa estadístico InfoStat version 2018P. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

3.5.5. Análisis multivariado – componentes principales

Con todos los resultados de la cuantificación de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) se realizó el análisis de componentes principales y conglomerados, el cálculo se realizó con el programa estadístico InfoStat version 2018P. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

3.6. Diseño experimental



Dónde:

M1: Triangulo de Donofrio, M2: Fochis de leche, M3: Milky, M4: Orquídea con leche, M5: Makao con leche, M6: Sublime, M7: Fochis con pasas, M8: Orquídea con leche/kiwicha, M9: Orquídea con leche /pecanas, M10: Exotic con leche/almendras; M11 Comincacao Pasta de cacao, r_1 , r_2 , r_3 : repeticiones.

Figura 1. Diseño experimental para la cuantificación de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS)

3.7. Análisis estadístico

- Cuantificación de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS)

Para evaluar los resultados de la evaluación de grasa, polifenoles totales y actividad antioxidante se utilizó el modelo estadístico Diseño Completo al Azar (DCA) con tres repeticiones, para lo cual se empleó el siguiente modelo matemático (GUTIERREZ y DE

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Dónde:

y_{ij} : Resultados del contenido de grasa, de polifenoles totales y actividad antioxidante.

μ : Efecto de la media general de las evaluaciones

t_i : Efecto de los tratamientos

e_{ij} : Efecto del error experimental

Variable Independiente: Muestra de chocolate comercial, muestra de pasta de cacao

Variable Dependiente: Resultados del contenido de grasa, evaluación de polifenoles totales y actividad antioxidante (DPPH y ABTS).

De existir significancia entre los tratamientos, se evaluó con la prueba Tuckey, con un nivel de significación del 5%. El análisis estadístico se realizó mediante el software InfoStat version 2018P. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

- **Análisis multivariado y componentes principales para grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS)**

Para evaluar los resultados de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) se utilizó el modelo estadístico multivariado no paramétrica de componentes principales (PCA) con el fin de reducir la dimensionalidad del conjunto de datos obtenidos. Se considera una serie de variables (x_1, x_2, \dots, x_p) sobre un grupo de objetos o individuos y se trata de calcular, a partir de ellas, un nuevo conjunto de variables (y_1, y_2, \dots, y_p), no correlacionadas entre sí, cuyas varianzas vayan decreciendo progresivamente (FRANCO e HIDALGO, 2003).

$$Y_j = a_{j1} x_1, a_{j2} x_2 + \dots + a_{jp} x_p = a^{\circ}_j x$$

Siendo a°_j ($a_{j1}, a_{j2}, \dots, a_{jp}$) un vector de constantes, y $x=(x_1, x_2, \dots, x_p)$

Variables independientes: Muestra de chocolate comercial, muestra de pasta de cacao

Variable dependiente: Resultados del contenido de grasa, evaluación de polifenoles totales y actividad antioxidante (DPPH y ABTS).

Donde debe existir significancia entre los tratamientos, se evaluará con la prueba de Duncan con un nivel de significación del 5%. El análisis estadístico se realizará mediante el software InfoStat version 2018P. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Contenido de grasa en chocolates comerciales

La manteca de cacao es una de las grasas vegetales más caras del mercado pues posee características industriales importantes como el punto de fusión bajo, muy cercano a la temperatura del cuerpo que la hacen indispensable para la elaboración de chocolates y productos de confitería.

En la Figura 2 y Cuadro 10 se presenta los resultados del contenido de grasa de 11 muestras de chocolates comerciales, realizando el análisis estadístico se encontró diferencia significativa (A-III), mediante la comparación de los promedios por medio de la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

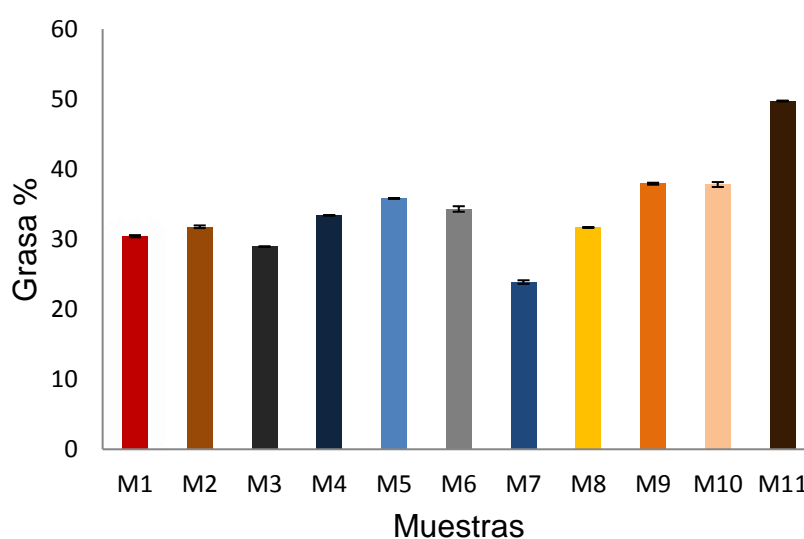


Figura 2. Representación del contenido de grasa en chocolates comerciales

Cuadro 10. Contenido de grasa en chocolates comerciales

Marca	Muestras	Extracto graso (%)
Triángulo D'Onofrio	M1	30,426 ± 0,153 ^f
Fochis de leche,	M2	31,776 ± 0,190 ^e
Milky	M3	28,940 ± 0,056 ^g
Orquídea con leche	M4	33,403 ± 0,034 ^d
Makao leche	M5	35,816 ± 0,014 ^c
Sublime	M6	34,316 ± 0,395 ^d
Fochis en barras con pasas	M7	23,876 ± 0,257 ^h
Orquídea con leche y kiwicha	M8	31,673 ± 0,020 ^e
Orquídea con leche y pecana	M9	37,926 ± 0,141 ^b
Exotic almendras	M10	37,806 ± 0,351 ^b
Comincacao	M11	49,733 ± 0,061 ^a

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

El mayor contenido de grasa lo presentó M11 (pasta de cacao) 49,733 ± 0,061%, la cantidad de grasa presente en la muestra de pasta de cacao concuerda con lo reportado por CODEX STAN 141 (1983); el cacao en pasta o pasta de cacao/chocolate es el producto obtenido del cacao sin cáscara ni germen obtenido de vainas de cacao de calidad comercial, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos constituyentes, la composición en cuanto a manteca de cacao en la pasta de cacao es de 47-60% m/m. Para CIENFUEGOS-JOVELLANOS (2016) el porcentaje de grasa de las pastas de

cacao estuvo comprendida entre 35,2% a 49,2%. DÍAZ (2013) obtuvo de 40,1 a 45,3% con un promedio de 42,65% de grasa en pastas de cacao elaborados de diferentes clones. ESPÍN (2013) obtuvo 23,45 a 41,37% en pasta de cacao elaborados con diferentes clones de cacao.

Entre las muestras analizadas el mayor contenido de grasa se presentó en M9 (Orquídea con leche y pecana) $37,926 \pm 0,141$ % y M10 (Exotic almendras) $37,806 \pm 0,351$ %; al respecto NDIFE *et al.* (2013) indica que el contenido de grasa de las muestras de chocolate oscilaron entre 31,25% y 35,10%; el aumento significativo en el contenido de grasa de las muestras de chocolate puede ser debido a los ingredientes añadidos en la producción de chocolate, tales como manteca de cacao, leche y nuez moscada y otra grasa. El alto contenido de grasa en los chocolates con pecanas puede deberse a lo citado por CANAZAS (2015) quien indica que los lípidos de la pecana representan la fracción principal (cerca de 72,1%). Según FERNANDES *et al.* (2017) las pecanas se componen de aproximadamente 58 a 74% de aceite, además FLORES-CÓRDOVA *et al.* (2016) indican que en una porción de base comestible de pecana el contenido de lípidos fue de 69%. El contenido de grasa significativo en la muestra del chocolate Exotic almendras puede deberse a que esta semilla es una buena fuente en grasa tal como lo indica ZHU *et al.* (2015) 46,1 – 63,5 g/ 100 g. KODAD *et al.* (2014) 50,58 – 64,95% y MAESTRI *et al.* (2015) en almendras nativas de Argentina 48,0% a 57,5% de lípidos.

Las muestras M5 (Makao leche) $35,816 \pm 0,014$ %, M4 (Orquídea con leche) $33,403 \pm 0,034$ % y M6 (Sublime) $34,316 \pm 0,395$ %, según los resultados se puede indicar que se encuentran dentro del rango reportado por

TORRES (2012) del 29 al 43% de grasa y corresponde sobre todo a manteca de cacao. En este tipo de chocolate a la fracción de grasa original se le suma aquella de origen lácteo, fundamentalmente saturada. FERNÁNDEZ *et al.* (2014) en su estudio sobre chocolates comerciales consumidos en Venezuela encontró un contenido de grasa de 39- 27,10%, siendo el chocolate blanco el que presentó el mayor contenido. PEKER (2013) considera convencionalmente el chocolate contiene un 30 a 40% de grasa que provienen de la grasa de la leche y manteca de cacao.

La muestra M6 (Sublime) presentó un contenido de grasa de $34,316 \pm 0,395\%$ cabe aclarar que en la etiqueta indica que tiene grasa de girasol, BECKETT (2011) cita que otras grasas tales como aceites vegetales se pueden usar para producir productos de chocolate económicos, sin embargo, en la mayoría de las regiones del mundo, estos productos no pueden legalmente ser llamado chocolate. El contenido de grasa de la muestra M2 (Fochis de leche) tuvo $31,776 \pm 0,190\%$ y M8 (Orquídea con leche y kiwicha) $31,673 \pm 0,020\%$; podemos indicar para el primero que en su composición tiene grasa vegetal, algunas grasas vegetales son similares a la manteca de cacao en la composición de triglicéridos, y se pueden añadir al chocolate, sin causar un efecto significativo sobre la textura, legalmente estas grasas vegetales están permitidos hasta el 5% en la UE para que el producto pueda ser vendido con la denominación de chocolate (BECKETT, 2015). Para el chocolate con leche con inclusión de kiwicha (M8) se sabe que la kiwicha es pobre en grasa tal como lo indica BURGOS y ARMADA (2015) 4,66 g / 100 g; PASCUAL y ZAPATA, (2010); 7,1% de grasa BRAVO *et al.* (2013) 8,35% de grasa en

granos de kiwicha. BECKETT (2011) indica que, en muchos países, la grasa de la leche es la única grasa distinta de la manteca de cacao que se permite en el chocolate sin declaración.

Los chocolates con el menor contenido de grasa fueron los chocolates con leche M1 ($30,426 \pm 0,153\%$); M3 ($28,940 \pm 0,056\%$) y chocolate con pasas M7 ($23,876 \pm 0,257\%$), de este grupo cabe resaltar que el M1 incluye como componente grasa de palma y girasol, la M7 (Fochis con pasas) contiene grasa vegetal y pasas, esta última tiene bajo contenido de grasa tal como reporta GIL (2010) $0,5 \text{ g/ } 100 \text{ g}$ de grasa de uvas pasas. GHRAIRI (2013) en 5 variedades de uvas pasas encontró $2,21 \pm 0,08\%$. El menor contenido de grasa afecta la calidad del producto tal como lo indica BECKETT (2017), de los diferentes componentes en el chocolate, la fase grasa tiene mayor influencia en su calidad. La fase grasa afecta a las propiedades reológicas del chocolate fluido, la liberación del molde, broche, brillo, la prevención de la floración, propiedades de fusión y liberación de sabor.

4.2. Polifenoles totales en chocolates comerciales

Para la cuantificación de polifenoles totales de los chocolates comerciales se estableció una curva patrón con ácido gálico, determinándose concentraciones de trabajo comprendidas entre 50 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (A-I). Al respecto se puede indicar que el ácido gálico se utiliza ampliamente como un estándar de comparación para la determinación del contenido de polifenoles totales en diversos alimentos o productos naturales por el método de Folin-Ciocalteu, los resultados se presentan en general como equivalente de ácido

gálico (EAG) (CHEN *et al.*, 2015). La correlación encontrada fue $R^2=0,990$, al respecto GARCIA (2015) indica que existe un buen grado de correlación entre las variables X e Y cuando el valor de R^2 está cerca de 1.

Los resultados del contenido de polifenoles totales se presentan en el Cuadro 11 y Figura 3; realizando el análisis estadístico se encontró diferencia altamente significativa (A-IV).

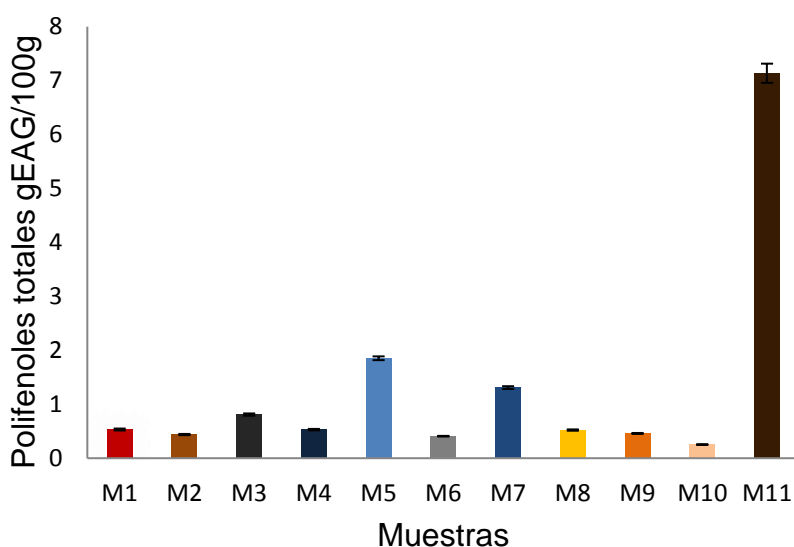


Figura 3. Contenido de polifenoles totales en chocolates comerciales.

Según la comparación de los promedios mediante la prueba de Tukey ($p<0,05$). La mayor cantidad de polifenoles correspondió a la M11 (pasta de cacao) $7,137 \pm 0,178$ g EAG/100g, el resultado encontrado concuerda con los reportes de TABERNERO *et al.* (2006) 77,59 mg EAG/g. YANZAPANTA (2014) reporta 4 a 7 g EAG/100 g y CASIQUE (2014) $6,996 \pm 0,015$ gEAG/100g, RADOJCIC *et al.* (2009), en pasta de cacao de Ecuador $8,14 \pm 0,13$, Ghana $4,01 \pm 0,04$, Madagascar $12,65 \pm 0,31$, México $8,37 \pm 0,15$, Sao

Tome $4,92 \pm 0,13$ y Venezuela $5,19 \pm 0,19$ g EAG/100g de muestra. La pasta de cacao es considerada como la materia prima para el procesamiento de chocolates tal como indican WOLKE (2005) se habla de pasta de cacao porque la fricción de la molienda derrite la grasa, así que se obtiene una pasta marrón refulgente que es la materia prima del chocolate.

Cuadro 11. Contenido de polifenoles totales en chocolates comerciales

Chocolate	Muestra	Polifenoles totales gEAG/100g
Triangulo D'Onofrio	M1	$0,532 \pm 0,018^d$
Fochis de leche,	M2	$0,439 \pm 0,011^e$
Milky	M3	$0,809 \pm 0,021^d$
Orquídea con leche	M4	$0,530 \pm 0,013^d$
Makao leche	M5	$1,853 \pm 0,035^b$
Sublime	M6	$0,408 \pm 0,006^e$
Fochis en barras con pasas	M7	$1,309 \pm 0,026^c$
Orquídea con leche y kiwicha	M8	$0,522 \pm 0,012^e$
Orquídea con leche y pecana	M9	$0,459 \pm 0,009^e$
Exotic almendras	M10	$0,253 \pm 0,006^e$
Comincacao	M11	$7,137 \pm 0,178^a$

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

Realizando la comparación entre las muestras de chocolate comerciales el mayor contenido se presentó en M5 (Makao leche) $1,853 \pm 0,035$ g EAG/100g; siendo superior a los reportes de ZUJKO y WITKOWSKA

(2014) quienes reportan en chocolate de 46% de cacao $1,617 \pm 161$ mg EAG / 100 g, VERTUANI *et al.* (2014) encontró en chocolate con leche 15,13 mg EAG/g. Cabe resaltar que la muestra M5 según la etiqueta lleva la denominación de 45% pasta de cacao y otros (leche entera en polvo, manteca de cacao y azúcar) esto posiblemente sea la razón de tener un elevado polifenoles totales, ya que al disminuir el porcentaje de sólidos no grasos de cacao en la muestra se observa una disminución de la capacidad antioxidante asociada con un menor contenido de polifenoles totales (VERTUANI *et al.*, 2014). Asimismo, el chocolate con leche debe contener, en relación con el extracto seco, no menos del 25% de extracto seco de cacao (incluido un mínimo del 2,5% de extracto seco magro de cacao) y un mínimo especificado de extracto seco de leche entre el 12% y el 14% (incluido un mínimo entre el 2,5% y el 3,5% de materia grasa (CODEX STAN 87-1981).

El segundo lugar en el contenido de polifenoles totales en los chocolates comerciales fue para el M7 (Fochis con pasas) $1,309 \pm 0,026$ g EAG/100g, este valor de polifenoles concuerda con lo reportado por LEE *et al.* (2012) quienes encontraron en chocolate con leche 1,108 mg EAG/g. según KOMES *et al.* (2013) la adición de arándanos y pasas secas aumentó el contenido de polifenoles totales en chocolates. GODOČIKOVÁ *et al.* (2017) indica que en chocolates con frutos secos, puede mejorar el contenido de polifenoles. Así mismo, cabe resaltar que en la etiqueta de producto el orden de los ingredientes fue azúcar, pasta de cacao, pasas, manteca de cacao y otros, como sabemos las pasas de uvas son una buena fuente de polifenoles totales tal como indica KAMILOGLU *et al.* (2014) quienes obtuvieron polifenoles

totales en uvas pasas 1322 ± 59 mg EGA/ 100 g. BREKSA *et al.* (2010) encontró en seis cultivares y 10 selecciones de pasas de uva que el rango de polifenoles fue 316,3 a 1141,3 mg EAG/100g y KOLEVA-VALKOVA (2016), en pasas $10,579 \pm 0,505$ mg EAG /g.

Según el ordenamiento del contenido de polifenoles totales en chocolates comerciales el tercer lugar correspondió a los chocolates con leche M1 (Triangulo D'Onofrio); M3 (Milky) y M4 (Orquídea con leche) fueron estadísticamente iguales, comparando con la bibliografía los resultados se encuentran dentro del rango de las publicaciones de ZUJKO y WITKOWSKA (2014) polifenoles en chocolate con leche $0,515 \pm 0,079$ g EAG/ 100g. ZARIĆ *et al.* (2011) polifenoles totales $0,645 \pm 0,006$ g EAG/100g de muestra para el chocolate con leche. Por otro lado, cabe indicar que en la etiqueta del producto se presenta el orden de los ingredientes: azúcar, leche entera en polvo, manteca de cacao, pasta de cacao, este orden precisa que existe mayor cantidad de manteca de cacao que pasta de cacao, lo que estaría posiblemente afectando el contenido de polifenoles totales, tal como indica HARWOOD *et al.* (2013), los dulces de chocolate con leche, tienden a tener el contenido de polifenólico inferior y a menudo mayor contenido de azúcar, son generalmente menos amargo y astringente que los chocolates oscuros.

El menor contenido de polifenoles totales en los chocolates comerciales se encontró en las muestras de M9 (Exotic almendras) $0,459 \pm 0,009$, M2 (Fochis de leche) $0,439 \pm 0,011$, M6 (Sublime) $0,408 \pm 0,006$, M8 (Orquídea con leche y kiwicha) $0,522 \pm 0,012$, M10 (Exotic almendras) $0,253 \pm 0,006$ g EAG/100g, entre las muestras no se encontró diferencia estadística

significativa, tan solo diferencia numérica; los valores reportados se encuentran dentro del rango de otras publicaciones como BRCANOVIC *et al.* (2013) que para chocolates con leche encontró 0,284 a 0,559 g EAG/100 g de muestra, KOMES *et al.* (2013) en chocolate con leche e inclusiones 0,212 a 0,608 g EAG/100 g, YOO *et al.* (2011) en chocolates con leche y polvo de café 0, 1, 2, 3 y 4% de peso, los polifenoles fueron $200,7 \pm 11,1$; $230,7 \pm 10,8$; $267 \pm 12,4$; $290,4 \pm 17,4$; $315,4 \pm 21,3$ mg GAE/100g respectivamente. Asimismo, las muestras que tuvieron dentro de sus ingredientes pecanas, almendras, maní y kiwicha el contenido de polifenoles totales fue menor comparado a todas las muestras analizadas, este comportamiento puede ser explicado por KURTLAR (2011) quien sugirió que las almendras adicionadas al chocolate podrían disminuir los contenidos fenólicos y flavonoides totales y la capacidad antioxidante debido a interacciones polifenoles con proteínas de la almendra.

Según COOPER *et al.* (2008), los chocolates con inclusiones (frutas, nueces, caramelo, galletas, etc.) cuyos ingredientes pueden contener polifenoles, pero si las inclusiones desplazan el contenido de pasta de cacao provocan una disminución en el contenido de polifenoles. Según TODOROVIC *et al.* (2015) la adición de frambuesas a chocolates oscuros no tuvo influencia significativa en sus polifenoles totales. De los mismos resultados podemos indicar que el orden de los ingredientes presentados en la etiqueta prioriza al azúcar, leche entera en polvo y manteca de cacao; pasta de cacao y las inclusiones (pecanas, maní, almendras y kiwicha) la cantidad incluida es mínima, lo que posiblemente haya generado que el contenido de polifenoles sea bajo, tal como indica HARWOOD *et. al* (2013) los compuestos polifenólicos

son a menudo percibidos como amargo y astringente y un aumento en el contenido tiene la capacidad de provocar sensaciones más fuertes de amargura y astringencia; por otro lado, cabe resaltar que el contenido de polifenoles totales reportados referente a las inclusiones fueron, ABE *et al.* (2010) maní 597 ± 6 mg GAE/ 100g; DODEVSKA *et al.* (2015) almendras 408 ± 49 mg GAE/ 100g. BOLLING (2017), almendras 64–71 mg GAE/ 100g; HE *et al.* (2011) pecanas 14,63 mg GAE/g; FLORES-CÓRDOVA *et al.* (2017) el contenido de polifenoles totales de pecana variedad wichita 23,13 mg GAE/g y variedad wenster, 19,25 mg GAE/g. y HONG *et al.* (2014) los polifenoles en las variedades de kiwicha van de 0,09 a 0,17 g EAG/100g.

De todos los chocolates comerciales analizados el contenido de polifenoles totales estuvo comprendido entre $0,253 \pm 0,006$ a $1,853 \pm 0,035$ g EAG/ 100g, siendo superior a lo reportado por MOLNAR (2012) en chocolates comerciales de Austria 0,320 – 0,952 g EAG/100g, TODOROVIC *et al.* (2015) en chocolates comerciales de Serbia 0,203 a 1,265 g EAG/100 g, BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.* (2015) chocolates con extracto de ortiga (0,119 a 0,868 g EAG/100g). GODOČIKOVÁ *et al.* (2016) chocolates artesanales 0,814 a 1,637 g EAG/100g. La variación encontrada en el contenido de polifenoles puede ser explicada por JABŁOŃSKA-RYŚ (2012) que los chocolates con leche, a pesar de una participación similar de sólidos de cacao (25-30%), difieren significativamente, en términos del contenido de polifenoles. ÖVET (2015) la diferencia en el contenido de polifenoles entre los chocolates con leche, no solo es por la cantidad de cacao sino también por la calidad del cacao y las condiciones de procesamiento del chocolate y la producción de cacao.

4.3. Capacidad antioxidante en chocolates comerciales

4.3.1. Capacidad de inhibir el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Los resultados de la capacidad para inhibir al radical DPPH en los chocolates comerciales se presenta en el Cuadro 12 y Figura 4 realizando el análisis estadístico se encontró diferencia altamente significativa ($p \leq 0,05$), según la prueba de Tukey la mayor eficiencia frente al radical lo presentó M11 (pasta de cacao) $IC_{50} 40,32 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$, concordando con los reportes de CHAVEZ y ORDOÑEZ (2013) el IC_{50} del pasta de cacao $52,930 \pm 0,340 \mu\text{g/mL}$ CASIQUE (2014) encontró que el IC_{50} de pasta de cacao fue $41,56 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$. Según DİDİŞ (2015) el IC_{50} frente radical DPPH en pasta de cacao natural y alcalinizado fue $0,047 \pm 0,001 \text{ mg/ml}$ y $0,064 \pm 0,001 \text{ mg/ml}$, respectivamente. La alta capacidad de inhibir al radical DPPH se debe posiblemente a la presencia de flavonoides del cacao como la epicatequina y catequina, y procianidinas, esta última proporcionan la mayor parte de la actividad antioxidante en los productos de cacao (KATZ *et al.*, 2011).

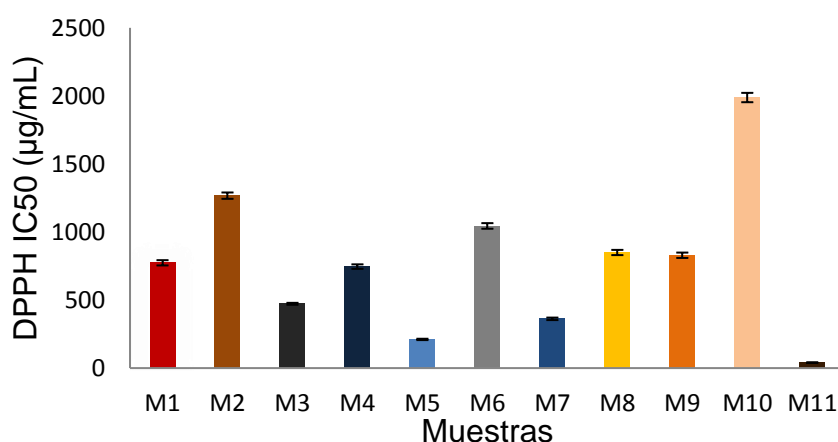


Figura 4. IC_{50} con el radical DPPH en chocolates comerciales.

Cuadro 12. Resultados del IC₅₀ del radical DPPH en chocolates comerciales.

Muestra	Muestra	IC ₅₀ (µg/mL)
Triangulo D'Onofrio	M1	773,68 ± 19,49 ^{de}
Fochis de leche,	M2	1267,02 ± 23,36 ^b
Milky	M3	472,44 ± 7,09 ^f
Orquídea con leche	M4	745,73 ± 16,64 ^e
Makao leche	M5	210,78 ± 4,83 ^h
Sublime	M6	1044,59 ± 20,56 ^c
Fochis en barras con pasas	M7	361,933 ± 9,13 ^g
Orquídea con leche y kiwicha	M8	849,44 ± 19,15 ^d
Orquídea con leche y pecana	M9	828,98 ± 19,67 ^{de}
Exotic almendras	M10	1987,92 ± 34,34 ^a
Comincacao	M11	40,32 ± 0,91 ⁱ

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

Realizando la comparación entre todos los chocolates comerciales se puede apreciar que la mayor capacidad para inhibir al radical DPPH lo presentó M5 (Makao leche) IC₅₀ 210,78 ± 4,83 µg/mL, y la menor eficiencia se presentó en M2 (Fochis de leche) con IC₅₀ 1267,02 ± 23,36 µg/mL; esta variación puede deberse a lo reportado por DI MATTIA *et al.* (2017) quién indica que la actividad antioxidante del chocolate está en función de la materia prima, el procesamiento y la formulación. Según TITTONA *et al.* (2014) los chocolate con leche que tuvieron una menor cantidad de polifenoles tuvieron menor actividad antioxidante, debido a la pequeña adición de pasta en su

formulación y mayor cantidad de azúcar. LANGER *et al.* (2011) indican que el porcentaje de sólidos de cacao declarados en la etiqueta no son indicador del contenido de antioxidantes puesto que este porcentaje incluye la pasta de cacao, el cacao en polvo (aporte de antioxidantes) y manteca de cacao (sin aporte de antioxidantes). De las muestras evaluadas se puede afirmar que M5 (Makao leche) fue el que tuvo mayor contenido de polifenoles totales, esto concuerda con lo citado por DANI *et al.* (2012) que los chocolates con las mayores tasas de polifenoles presentaron menores valores de IC₅₀.

Los chocolates comerciales con pasas presentaron una buena capacidad para inhibir el radical DPPH como el M7 (IC₅₀ 361,933 ± 9,13 µg/mL); enriquecer los chocolates con leche, con uvas mejoran la capacidad antioxidante (CARVALHO, 2016). Las pasas en el chocolate comercial ocuparon el 17% del producto, como se sabe la, capacidad antioxidante de las pasas es variable; la actividad antioxidante en pasas de la variedad Flame está relacionado con el ácido gálico, astilbina, quercetina-3-O-glucurónido, isorhamnetina e isorhamnetina-hexosido, en la variedad Arizul con (+) - catequina, caftárico y fertárico y en la variedad Sultanina con resveratrol (FABANI *et al.*, 2017). MNARI *et al.* (2016) en orden de disminución de la capacidad de captación de radicales DPPH, en variedades de pasas fueron Chriha 3,01 ± 0,05 > Meski 2,71 ± 0,03 > Assli 3,50 ± 0,07 > Razeki 3,44 ± 0,06.

Los chocolates comerciales con leche y maní (M6), kiwicha (M8), pecana (M9), almendras (M10) no tuvieron buena capacidad para inhibir al radical DPPH, el rango estuvo comprendido entre IC₅₀ 828,98 ± 19,67 a 1987,92 ± 34,34 µg/mL, este comportamiento puede deberse a lo reportado por

IBRIĆ y ČAVAR (2014), que el contenido fenólico total y la actividad antioxidante dependen de la cantidad de cacao en los productos. VERTUANI *et al.* (2014) indica que en general, al disminuir el porcentaje de sólidos de cacao sin grasa, se puede observar una disminución en la capacidad antioxidante asociada con un menor contenido de polifenoles totales. Según GODOČIKOVÁ *et al.* (2016), si el producto contiene más manteca de cacao, los valores de la capacidad antioxidante serán menores que los productos con el mismo contenido de cacao, pero más sólidos de cacao. REPO-CARRASCO-VALENCIA *et al.* (2010) indican que la kiwicha no contiene cantidades cuantificables de flavonoides.

Del Cuadro 12 y Figura 5 se deduce que la capacidad antioxidante de los chocolates comerciales estuvo comprendida entre IC_{50} $210,78 \pm 4,83$ a $1987,92 \pm 34,3$ $\mu\text{g/mL}$, teniendo una mejor capacidad antioxidante que los reportes de IBRIĆ y ČAVAR (2014) en chocolate con leche 29% de cacao, la capacidad antioxidante frente al radical DPPH fue IC_{50} $2,040$ mg/mL y MOLNAR, (2012) en chocolate con leche IC_{50} $752,77$ $\mu\text{g/mL}$. La capacidad antioxidante de un chocolate es afectada por la cantidad de pasta de cacao que contiene el producto, IKRAWAN y ACHYADI (2016) en chocolates negros con adición de leche frente al DPPH IC_{50} fue $149,2$ $\mu\text{g/mL}$. NAZARUDDIN *et al.* (2006) y KOWALSKA y SIDORCZUK (2007) la semilla de cacao y sus productos (pasta de cacao, polvo de cacao y chocolate) son ricos particularmente en catequinas y procianidinas.

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

Realizado el análisis estadístico de los resultados de la capacidad de inhibir al radical ABTS^{o+} de los chocolates comerciales incluyendo el testigo pasta de cacao se encontró diferencia altamente significativa y mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) como se muestra en el Cuadro 13 y Figura 5; la pasta de cacao tuvo la mayor eficiencia para inhibir a este radical ($IC_{50} 35,49 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$), este resultado fue similar al reportado por CASIQUE (2014) IC_{50} del radical ABTS^{o+} en pasta de cacao, $IC_{50} 38,57 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$; CHAVEZ y ORDOÑEZ (2013) encontraron que la capacidad de inhibir el radical IC_{50} ABTS^{o+} de pasta de cacao fue $IC_{50} 36,850 \mu\text{g/mL}$, Según EFRAIM *et al.* (2011) la pasta de cacao posee una capacidad antioxidante de hasta seis veces mayor que la de un chocolate con leche.

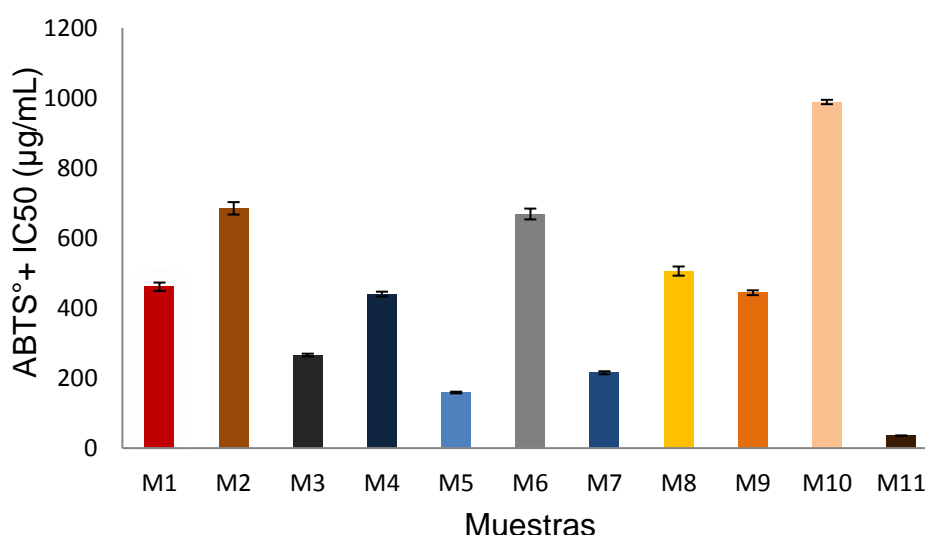


Figura 5. IC_{50} frente al radical ABTS^{o+} en chocolates comerciales.

Cuadro 13. Resultados del IC₅₀ del radical ABTS^{o+} en chocolates comerciales.

Muestra	Muestra	IC ₅₀ (µg/mL)
Triangulo D'Onofrio	M1	460,85 ± 12,07 ^{cd}
Fochis de leche, Milky	M2	684,86 ± 17,75 ^b
Orquídea con leche	M3	265,95 ± 3,83 ^e
Makao leche	M4	440,05 ± 6,77 ^d
Sublime	M5	158,78 ± 2,45 ^g
Fochis en barras con pasas	M6	668,63 ± 15,50 ^b
Orquídea con leche y kiwicha	M7	215,16 ± 4,32 ^f
Orquídea con leche y pecana	M8	505,68 ± 13,1 ^c
Exotic almendras	M9	443,79 ± 6,85 ^d
Comincacao	M10	988,55 ± 6,21 ^a
	M11	35,49 ± 0,59 ^h

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

Entre los chocolates con leche evaluados también se encontró diferencia estadística, comparando los promedios la mayor eficiencia lo presentó el chocolate con leche M5 (Makao leche) con IC₅₀ 158,78 ± 2,45 µg/mL), este tratamiento tuvo mayor contenido de polifenoles y la mayor capacidad de inhibir el radical ABTS^{o+}; según VERTUANI *et al.*, (2014) al aumentar el porcentaje de cacao en los chocolates, la cantidad de polifenoles totales mejora y la capacidad antioxidante del producto aumenta. CUELLAR y OVALLES (2017) indica que para aprovechar al máximo las propiedades antioxidantes del chocolate, el porcentaje de cacao debe ser mayor a 70%,

debe ser amargo y debe tener el menor contenido posible de leche y aditivos. El chocolate con inclusión de pasas también presentó buena capacidad para inhibir al radical $ABTS^{\circ+}$ IC_{50} $215,16 \pm 4,32 \mu\text{g/mL}$ comparado a los otros chocolates comerciales, este resultado concuerda con lo reportado por CARVALHO (2016) que la capacidad antioxidante del chocolate con leche con adición de uvas fue mayor comparado con el chocolate con leche con adición de col y con el chocolate control. CASTILLO (2015) en chocolate Bitter con 1% de inclusión de piel de uva encontró IC_{50} $0,053 \pm 0,002 \text{ mg/mL}$ frente al radical $ABTS^{\circ+}$.

La menor capacidad para inhibir el radical $ABTS^{\circ+}$ se presentaron en los chocolates de leche con almendras, maní y barra solida (IC_{50} $668,63 \pm 15,50$ a $988,55 \pm 6,21 \mu\text{g/mL}$) Según STUMPF *et al.* (2012), la baja actividad antioxidante del chocolate con leche, puede ser explicado por la propia adición de la leche como componente y también, debido al alto porcentaje de azúcar que lo componen. Los compuestos de polifenoles tienen la capacidad de asociarse con proteínas, por lo que la formación de complejos de proteína de leche y polifenoles podría ser la razón de la reducción de la capacidad antioxidante de los productos de cacao con leche (SERAFINI *et al.*, 2003).

Se evaluó la capacidad antioxidantes por los dos métodos el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el método $ABTS^{\circ+}$, observando que se necesita menor cantidad de muestra para poder inhibir el radical $ABTS^{\circ+}$ en comparación de la cantidad utilizada para inhibir el radical DPPH; Así mismos, para evaluar la capacidad antioxidante se debe utilizar al menos dos pruebas

para la determinación como recomiendan DI MATTIA *et al.* (2017) los ensayos más comunes para evaluar la capacidad antioxidante como ABTS^{°+} y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), capacidad antioxidante radical de oxígeno, parámetro antioxidante total de captura de radicales (TRAP) y FRAP se basan en diferentes mecanismos de reacción (transferencia de electrones individual, transferencia de átomos de hidrógeno). Según BELŠČAK-CVITANOVIĆ *et al.* (2010), el radical ABTS reacciona con antioxidantes hidrofílico y lipófilo, mientras que el radical DPPH reacciona solo con hidrófilo.

4.4. Análisis de multivariado – componentes principales

Los resultados del contenido de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS^{°+}) realizados en las muestras de chocolates comerciales, fueron analizados mediante componentes principales (A-VII), según los resultados estadísticos se puede concluir que en el biplot de variables del primer componente (CP1) separa al contenido de polifenoles totales de las demás variables, el cual representa el 66,8% de la variabilidad total de los análisis realizados (Figura 6). Asimismo, el contenido de grasa de los chocolates comerciales representa el 30,7% de la variabilidad del segundo componente (CP2) y en general ambos componentes representan el 97,5% de la variabilidad total.

De los resultados, se puede indicar que el contenido de polifenoles totales en las muestras de chocolates comerciales fue bajo ($0,253 \pm 0,006$ a $1,853 \pm 0,035$ gEAG/100g), cabe resaltar que todos los chocolates tuvieron $\leq 45\%$ de cacao (pasta de cacao y manteca de cacao). Según BRCANOVIC

(2013) se puede esperar que el chocolate con leche contenga los niveles más bajos de polifenoles, ya que contiene la menor cantidad de pasta de cacao. MOLNAR (2012) y MEDEIROS *et al.* (2015) indican que el chocolate con leche posee menor actividad antioxidante, esto se debe al bajo contenido de polifenoles y este tipo de chocolates tiene mayor cantidad de azúcar en su preparación.

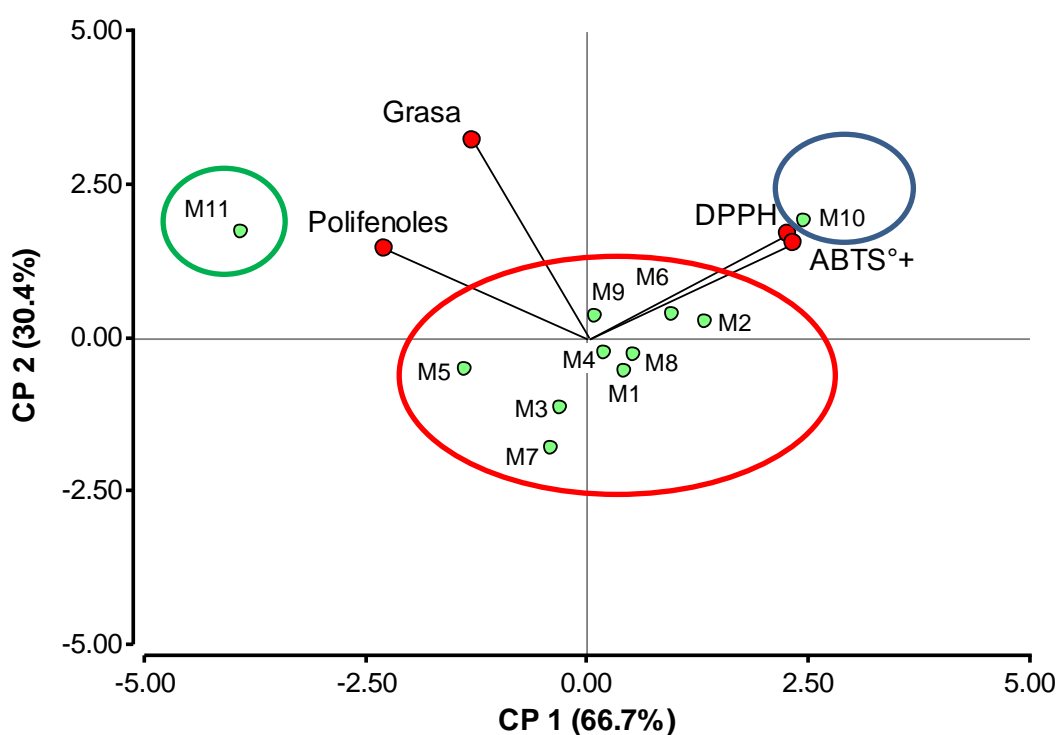


Figura 6. Comportamiento del biplot de grasa, polifenoles totales, radicales de DPPH y ABTS^{°+} en los diferentes chocolates comerciales.

Considerando al segundo componente se puede indicar que en los chocolates comerciales, el contenido de grasa varió entre $28,940 \pm 0,056$ a $37,926 \pm 0,141\%$, este valor es alto, cabe aclarar que según lo detallado en la etiqueta referido a la grasa indica que es manteca de cacao y grasa vegetal. Según RODRIGUEZ (2008) la manteca de cacao posee la particularidad de

tener un punto de fusión próxima a la temperatura corporal por lo que es muy valiosa en la composición del chocolate. ALVIS *et al.* (2011) cita que en cualquier fórmula de chocolate, la grasa es el componente que mantiene al sistema como un todo y son las propiedades de la misma, modificada en alguna medida por las propiedades de la fase sólida son las que determinan el comportamiento tecnológico, las propiedades físicas, reológicas y de aceptación del chocolate.

Realizando el análisis estadístico mediante conglomerados de los tratamientos evaluados se puede diferenciar tres grupos (Figura 7); el primer grupo representa el 9,1% siendo M11 (pasta de cacao), según los resultados esta muestra presentó mayor contenido de grasa, polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS^{°+}), según CLARK (2008) la pasta de cacao es el ingrediente básico en todos los productos de chocolatería.

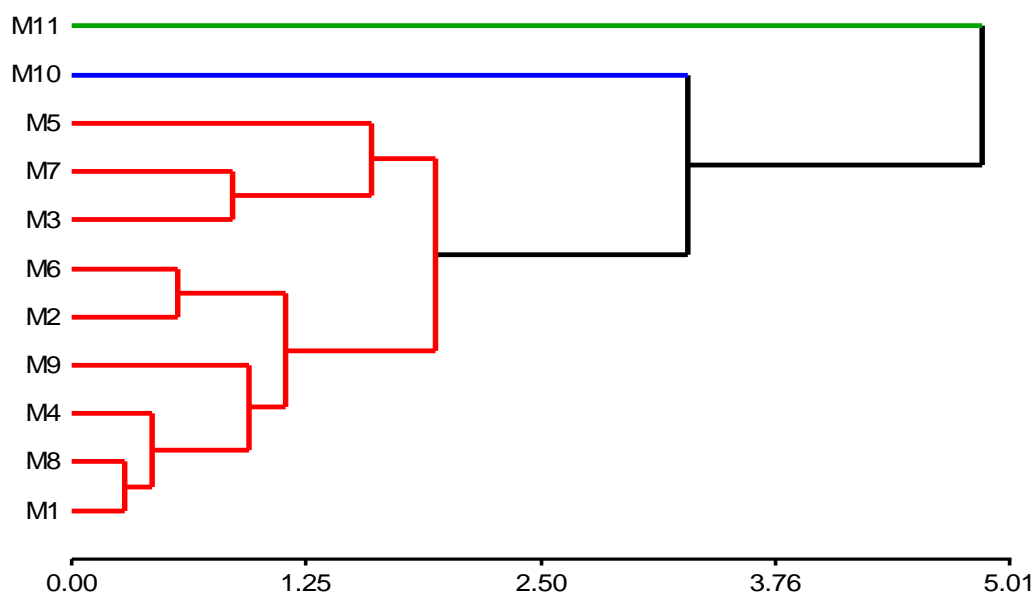


Figura 7. Análisis de conglomerados para chocolates comerciales.

El segundo grupo representa el 9,1%, estuvo conformado por la muestra M10 (chocolate con leche y almendras), al respecto se puede indicar que este producto tuvo el mayor contenido de grasa y menor en polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS). HANNUM y ERDMAN (2000) indican que el contenido de polifenoles puede disminuir de 100% a 10% en el producto de cacao final (chocolate) a lo largo los diferentes procesos de fabricación (fermentación, tostado, alcalinización). El tercer grupo representa el 81,2% y estuvo conformado por los chocolates con leche (M1, M2, M3, M4 y M5), el chocolate con leche/mani (M6), el chocolate con pasas (M7), el chocolate con leche/kiwicha (M8) y el chocolate con leche/pecana (M9). Al respecto GU *et al.* (2006) indican que los factores como el porcentaje de sólidos no grasos de cacao, otros ingredientes y el método de procesamiento pueden afectar la capacidad antioxidante de los chocolates. Según VERTUANI *et al.* (2014) el contenido de polifenoles y por lo tanto la actividad antioxidante del chocolate con leche es considerablemente más bajo que el oscuro, estos resultados pueden ser justificado por la menor cantidad de cacao en polvo en el chocolate con leche.

V. CONCLUSIONES

- El mayor contenido de grasa se encontró en chocolate Orquídea con leche y pecana ($37,926 \pm 0,141\%$) y el menor en chocolate Fochis con pasas ($23,876 \pm 0,257 \%$).
- El contenido de polifenoles en orden descendente es: M5 (Makao leche) > M7 (Fochis en barras con pasas) > M3, M1, y M4 (Milky, Triangulo D'Onofrio, y Orquídea con leche) > M9 (Orquídea con leche y pecana), M2 (Fochis de leche), M6 (Sublime), M8 (Orquídea con leche y kiwicha) y M10 (Exotic almendras).
- En chocolates con leche, la capacidad para inhibir al radical DPPH varió entre IC50 $210,78 \pm 4,83$ a $1267,02 \pm 23,36 \mu\text{g/mL}$; la capacidad para inhibir al radical ABTS^{°+} varió entre IC50 $158,78 \pm 2,45$ a $684,86 \pm 17,75 \mu\text{g/mL}$. En chocolates con inclusiones, la capacidad para inhibir al radical DPPH varió entre IC50 $361,933 \pm 9,13$ a $1987,92 \pm 34,34 \mu\text{g/mL}$ y frente al radical ABTS^{°+} varió entre IC50 $215,16 \pm 4,32$ a $988,55 \pm 6,21 \mu\text{g/mL}$.

VI. RECOMENDACIONES

- Consumir chocolates que contengan en su formulación mayor contenido de pasta de cacao.
- Estudiar los polifenoles totales y la capacidad antioxidante en chocolates con leche elaborados con diferentes proporciones de leche en su formulación.
- Estudiar los polifenoles totales, la capacidad antioxidante en chocolates con leche elaborados con diferentes inclusiones en su formulación.
- Estudiar el contenido calórico y el valor nutricional de los diferentes chocolates comerciales.

ABSTRACT

The research was carried out in the Universidad Nacional Agraria de la Selva's laboratories, located in the city of Tingo María, Peru. The objectives were: to quantify the DPPH and ABTS^{o+} free radicals in commercial chocolates. The fat content was determined using the soxleth method. Using the chocolate samples, the hydro alcoholic extract (100mg/mL) was prepared in order to analyze the total polyphenols and antioxidant capacity (DPPH and ABTS). The results were analyzed using the completely randomized design (CRD; DCA in Spanish) and the Tukey test ($p < 0.05$), the multivariate analysis with principal components. The fat content varied from 23.876 ± 0.257 to 37.926 ± 0.141 %. The greatest content of polyphenols was found in the chocolate with 45% cacao (1.853 ± 0.035 gEAG/100g), the antioxidant capacity against the DPPD radical had an IC₅₀ from 210.78 ± 4.83 to 1987.92 ± 34.34 $\mu\text{g/mL}$, against the ABTS^{o+} radical, the IC₅₀ varied from 158.78 ± 2.45 to 988.55 ± 6.21 . For the principal components analysis (CP- acronym in Spanish), the polyphenols (CP1) and the fat (CP2) represent 97.5% of the variability. For the analysis of conglomerates, three groups were identified; the first group (cacao paste), the second (milk chocolate/almonds) and the third group belongs to the rest of the chocolates. In conclusion, the commercial chocolates studied have a high fat content, low polyphenol content and antioxidant activity.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. 2010. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Food Science and Technology*, Campinas, 30: 254-259.
- ACUÑA F. 2006. Química orgánica. San José, Costa Rica. Ed. universidad estatal a distancia. 375 p.
- AGUIRRE H. 2017. Comparación de dos variedades de Cacao (*Theobroma cacao L.*) Nacional y CCN 51, mediante el injerto de cuña terminal con tres alturas de cámaras húmedas en el cantón Montalvo, provincia Los Ríos. Tesis ingeniería agronómica. Bolívar Universidad Estatal de Bolívar. 78 p.
- ALVIS, A.; PÉREZ, L.; ARRAZOLA, G. 2011. Determinación de las propiedades de textura de tabletas de chocolate mediante técnicas instrumentales. *Información tecnológica*, Cordova. 22(3):11-18.
- ADM. 2009. De Zaan cocoa y chocolate Manual, 40th anniversary. Switzerland. ADM Cocoa 169 p.
- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. 30 ed. Washington, EEUU, Association of Official Agricultural Chemists. 250 p.
- AFOAKWA, E. 2016. Chocolate science and technology. 2 ed. Iowa, EEUU. John Wiley y Sons. 536 p.

- AFOAKWA, E.; PATERSON, A.; FOWLER, M. 2007. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate—a review. *Trends in Food Science and Technology*. 18(6):290-298.
- BECKETT, S. 2011. *Industrial chocolate manufacture and use*. 4 ed. York, Inglaterra. Wiley-Blackwell. 720 p.
- BECKETT, S. 2015. *The Science of Chocolate*. 2 ed. London, Inglaterra, Royal Society of Chemistry Paperbacks. 250 p.
- BECKETT, S.; FOWLER, M.; ZIEGLER, G. 2017. *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*. York, Inglaterra. Wiley-Blackwell. 800 p.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; BENKOVIĆ, M.; KOMES, D.; BAUMAN, I.; HORŽIĆ, D.; DUJMIĆ, F.; MATIJAŠEC, M. 2010. Physical properties and bioactive constituents of powdered mixtures and drinks prepared with cocoa and various sweeteners. *Journal of agricultural and food chemistry, Zagreb*. 58(12): 7187-7195.
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; DURGO, K.; VOJVODIĆ, A.; BUŠIĆ, A. 2015. Nettle (*Urtica dioica* L.) extracts as functional ingredients for production of chocolates with improved bioactive composition and sensory properties. *Journal of food science and technology*. 52(12): 7723-7734.
- BOLLING, B. 2017. Almond polyphenols: methods of analysis, contribution to food quality, and health promotion. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16(3):346-368.
- BRAVO, M.; REYNA, J.; HUAPAYA, M. 2013. Estudio químico y nutricional de granos andinos germinados de quinua (*Chenopodium quinoa*) y kiwicha

- (*Amarantus caudatus*). Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, Perú. 16(1): 54-60.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT- Food science and Technology. 28(1): 25-30.
- BRCANOVIC, J.; PAVLOVIC, A.; MITIC, S.; STOJANOVIC, G.; MANOJLOVIC, D.; KALICANIN, B., VELJKOVIC, J. 2013. Cyclic voltammetric determination of antioxidant capacity of cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate samples: correlation with spectrophotometric assays and individual phenolic compounds. Food Technology and Biotechnology, Serbia. 51(4):460-470.
- BREKSA, A.; TAKEOKA, G.; HIDALGO, M.; VILCHES, A.; VASSE, J.; RAMMING, D. W. 2010. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. Food Chemistry. 121(3): 740-745.
- BURGOS, V.; ARMADA, M. 2015. Characterization and nutritional value of precooked products of kiwicha grains (*Amaranthus caudatus*). Food Science and Technology, Campinas. 35(3):531-538.
- CANAZAS, T. 2015. Formulación y elaboración de turrón con características funcionales, a partir de chia (*Salvia hispánica* L.), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa h & b*) y nuez de pecana (*Carya pecan l.*) fortificado, utilizando el diseño de mezclas. Tesis Ing. En industrias alimentarias. Arequipa. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. 206 p.

- CARVALHO, J. 2016. Desenvolvimento de chocolates ao leite com propriedades funcionais acrescidos de folhas de *Brassica oleracea* (couve) e frutos de *Vitis vinífera* (uva). Dissertação doctoral. São Paulo Universidade de São Paulo. 145 p.
- CASIQUE, C. 2014. Determinación del contenido de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante en alimentos preparados con pasta y polvo de cacao. Tesis Ing. En industrias alimentarias. Tingo María. Universidad nacional Agraria de la selva. 106 p.
- CASTILLO, K. 2015. Contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y evaluación sensorial de chocolate bitter con piel de camu camu, piel de uva morada y cascarilla de cacao. Tesis Ing. en industrias alimentarias. Tingo María. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 94 p.
- CASTILLO, A.; MEZA P. 2013. Estudio de factibilidad para la creación de una microempresa de producción y comercialización de galletas de quinua con chocolate crocante en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura. Ingenieros en contabilidad y auditoría. Ibarra, Ecuador. Universidad técnica del norte. 208 p.
- CASTRO, R.; HERNÁNDEZ, J.; MARCILLA, S.; CÓRDOVA, J.; SOLARI, F.; CHIRE, G. 2016. Efecto del contenido de grasa en la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de *Theobroma cacao* L." cacao". Ciencia e Investigación, Lima. 19(1):19-23.
- CAUSSE, C. 2010. Los secretos de salud de los antioxidantes, más joven durante más tiempo. Editorial Hispano Europea. 96 p.
- CEBALLOS, M. 2016. Estudio de los efectos de modificadores del

comportamiento reológico y del estado sólido en chocolate y sus ingredientes. Doctoral dissertation. Córdoba, Argentina. Universidad Católica de Córdoba 150 p.

CHAVEZ, R.; ORDOÑEZ, E. 2013. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento de pasta y polvo de cacao. R. ECI- Perú. 10(1): 42-50.

CHEN, L.; CHENG, C.; LIANG, J. 2015. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. Food chemistry. 170:10-15.

CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E. 2016. Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli) fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido. Tesis doctoral. Murcia. Universidad de Murcia. 213 p.

CLARK, M. 2008. Chocolate, recetas deliciosas para los amantes del chocolate. España Grupo planeta. 144p.

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

(http://www.fao.org/input/download/standards/67/CXS_087s.pdf.

documento, 09 noviembre. 2017).

CODEX STAN 87-1981, Rev 2003. Enm. 2016. Norma para el chocolate y productos de chocolate. [En línea]: (<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/shproxy/zh/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX>

- %2BSTAN%2B871981%252FCXS_087s.pdf documento, 14 setiembre. 2018).
- CODEX STAN 141-1983, Rev. 2001 Norma para el cacao en pasta (pasta de cacao/chocolate) y torta de cacao [en línea]: (http://www.fao.org/input/download/standards/69/CXS_141s.pdf. documento, 09 noviembre. 2017).
- COE, S.; COE, M.; RULL, M. 1999. La verdadera historia del chocolate. Fondo de Cultura Económica. 396 P.
- COOPER, A.; CAMPS-GIMENEZ., ALVAREZ, D.; RYTZ, A.; NAGY, K.; WILLIANSO, G. 2008. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. J. Agric. Food Chem, Lausanne. 56(1): 260–265.
- CORONADO, M.; VEGA, Y.; LEÓN, S.; GUTIÉRREZ, R.; VÁZQUEZ, M.; RADILLA, C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista chilena de nutrición, Santiago. 42(2): 206-212.
- CUELLAR, L.; OVALLES, L. 2017. Chocolate: más que un dulce. Convicciones, (7): 117-127.
- DANI, C.; STUMPF, C.; DA SILVA MEDEIROS, N.; DA SILVA FUNCHAL, C. 2012. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes tipos de chocolate em tecido hepático de ratos Wistar: estudo in vitro. Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. 1(3):236-245.
- DÍAZ, I. 2013. Caracterización y evaluación de pasta de cacao (*Theobroma cacao* L.) semi-refinado de 20 híbridos interclonales para Quevedo.

- Tesis Ing. Agroindustrial. Quevedo. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 129 p.
- DİDİŞ, M. 2015. Investigation of natural and processed cocoa and cocoa containing products for their antioxidant capacity and phenolic compounds. Doctoral. Middle East . Middle East technical university. 96 p.
- DILLINGER, T. L.; BARRIGA, P.; ESCÁRCEGA, S.; JIMENEZ, M.; LOWE, D. S.; GRIVETTI, L. E. 2000. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *The Journal of nutrition*. 130(8):2057S-2072S.
- DI MATTIA, C.; SACCHETTI, G.; MASTROCOLA, D.; SERAFINI, M. 2017. From Cocoa to Chocolate: The Impact of Processing on in vitro antioxidant activity and the effects of chocolate on antioxidant markers In vivo. *Frontiers in Immunology, Teramo*. 8:1207.
- DESROSIER, N. 1977. Elementos de Tecnología de alimentos. México, continental. p. 591-606.
- DODEVSKA, M.; ŠOBAJIĆ, S.; DJORDJEVIĆ, B. 2015. Fibre and polyphenols of selected fruits, nuts and green leafy vegetables used in Serbian diet. *J. Serb. Chem. Soc.* 80(1):21–33
- EFRAIM, P.; ALVES, A.; JARDIM, D. 2011. Polyphenols in cocoa and derivatives: Factors of variation and health effects. *Brazilian Journal of Food Technology, Campinas*. 14(3): 181-201.
- ESPÍN, C. 2013. Caracterización física-química y sensorial de 13 clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) tipo nacional establecidos en la Finca “La

- Represa” para obtención de pasta. Tesis ing. Agroindustrial. Quevedo, Ecuador. Universidad estatal de Quevedo. 139 p.
- FABANI, M.; BARONI, M.; LUNA, L.; LINGUA, M.; MONFERRAN, M., PAÑOS, H.; FERESIN, G. 2017. Changes in the phenolic profile of Argentinean fresh grapes during production of sun-dried raisins. *Journal of Food Composition and Analysis*. 58: 23-32.
- FAJARDO, G., HARTEL, R. 2011. Efecto de diferentes emulsificantes en las propiedades reológicas y la eflorescencia grasa del chocolate oscuro. In *Anales Científicos*. 72(1):1-12).
- FERNÁNDEZ, V., YEE, A., SULBARÁN, B., PEÑA, J. 2014. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en chocolates comerciales venezolanos. *Revista de la Facultad de Agronomía. Venezuela*. 31(1):129-144.
- FERNANDES, G., GÓMEZ-COCA, R., PÉREZ-CAMINO, M., MOREDA, W., BARRERA-ARELLANO, D. 2017. Chemical Characterization of Major and Minor Compounds of Nut Oils: Almond, Hazelnut, and Pecan Nut. *Journal of Chemistry*. 2017: 1-11.
- FLORES-CÓRDOVA, M., CHÁVEZ, E., CHÁVEZ-MENDOZA, C., GARCÍA-HERNÁNDEZ, J., PRECIADO-RANGEL, P. 2016. Bioactive compounds and phytonutrients in edible part and nutshell of pecan (*Carya illinoensis*). *Cogent Food & Agriculture*. Turkey. 2(1):1-12.
- FLORES-CÓRDOVA, M., SÁNCHEZ, E., MUÑOZ-MÁRQUEZ, E., OJEDA-BARRIOS, D., SOTO-PARRA, J., and PRECIADO-RANGEL, P. 2017.

- Phytochemical composition and antioxidant capacity in Mexican pecan nut. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 29(5): 346-350.
- GARCIA A. 2015. La interpretación de los datos. Una introducción a la estadística aplicada. Madrid, España, Editorial UNED. 140 p.
- GARTI, N. ; WIDLAK, N. 2015. Cocoa Butter and Related Compounds. . Champaign: AOCS Press. 540 p.
- GASTALVER C. 2015. Supervisión y ejecución de técnicas aplicadas a chocolates. España. Ed. Elearning, S.L.. 286 p.
- GHRAIRI, F., LAHOUAR, L., BRAHMI, F., FERCHICHI, A., ACHOUR, L., SAID, S. 2013. Physicochemical composition of different varieties of raisins (*Vitis vinifera* L.) from Tunisia. *Industrial crops and products*. 43: 73-77.
- GIL, A. 2010. Tratado de Nutrición; Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. 2 ed. España, Médica Panamericana. V.2. 812 P.
- GODOČIKOVÁ, L., IVANIŠOVÁ, E., ÁRVAY, J., PETROVÁ, J., KAČÁNIOVÁ, M. 2016. The comparison of biological activity of chocolates made by different technological procedures. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 10(1): 316-322.
- GODOČIKOVÁ, L., IVANIŠOVÁ, E., KAČÁNIOVÁ, M. 2017. The influence of fortification of dark chocolate with sea buckthorn and mulberry on the content of biologically active substances. *Advanced Research in Life Sciences*. 1(1):26-31.
- GONZALES, J., REY, F. 2017. Procesos básicos de pastelería y repostería. 2 ed. Madrid, España. Ediciones Paraninfo, S.A. 272 p.

- GREWELING, P. 2012. Chocolates and confections. formula, theory, and technique for the artisan confectioner. 2 ed. New Jersey, UUSS. John Wiley y Sons. 534 p.
- GU, L., HOUSE, S., WU, X., OU, B., PRIOR, R. L. 2006. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(11):4057-4061.
- GUTIERREA, H; DE LA VARA, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. 2 ed. México. Mc Graw-hill. 530p
- HANNUM, S., ERDMAN, J. 2000. Emerging health benefits from cocoa and chocolate. *J Med Food., Illinois*. 3(2):73–5.
- HARWOOD, M., ZIEGLER, G., HAYES, J. 2013. Tolerance for high flavanol cocoa powder in semisweet chocolate. *Nutrients*. 5(6):2258-2267.
- HE, Z., FU, M., MAO, L. 2011. Total phenolic, condensed tannin and antioxidant activity of four *Carya* species from China. *African Journal of Biotechnology*. 10(51): 10472-10477.
- HICKS, J.; TORRES-RAMOS, Y.; SIERRA-VARGAS, M. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de endocrinología y nutrición*. 14(4):223-226.
- HONG, S., CHO, K., JIN, Y., YEON, Y., KIM, S., NAM, J, SOHN, H. 2014. Comparison of growth characteristics, antioxidant activity and total phenolic contents of *Amaranthus* species according to the different cultivation regions and varieties in South Korea. *Korean Journal of Crop Science*. 59(1): 16-21.

- IBRIĆ, A., y ČAVAR, S. 2014. Phenolic compounds and antioxidant activity of cocoa and chocolate products. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*. 42:37-40.
- IKRAWAN, Y., ACHYADI, N. 2016. Fortifikasi tepung daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan susu bubuk dan konsentrasi kayu manis (*Cinnamomum burmani*) terhadap karakteristik dark chocolate. Tesis Doctoral. Fakultas Teknik Unpas, Bandung. 16 p.
- JACOME, W. 2015. Diseño de una planta de elaboración de chocolate negro y chocolate con leche a partir del pasta de cacao. Ingeniero agroindustrial. Quito, Ecuador. Escuela politécnica nacional. 146 p.
- JASSO, R. 2014. Desarrollo de un Nuevo producto “paleta helada a base de yogurt y aloe vera con cubierta de chocolate”. Tesis lic. químico en alimentos. Toluca, México. Universidad autónoma del estado de México. 97 p.
- JABŁOŃSKA-RYŚ, E. 2012. Zawartość polifenoli w czekoladach. *Nauka PrzyrodaTechnologie*. 6(2):1-11.
- JARRÍN, C. 2010. Diseño y desarrollo de un plan de buenas prácticas de manufactura para una empresa de elaboración de confites en el área de chocolate. Tesis Ing. Agroindustrial. Quito, Ecuador. Escuela Politécnica Nacional. 128 p.
- KADIVAR, S., DE CLERCQ, N., MOKBUL, M., DEWETTINCK, K. 2016. Influence of enzymatically produced sunflower oil based cocoa butter equivalents on the phase behavior of cocoa butter and quality of dark chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 48-55.

- KAMILOGLU, S., PASLI, A., OZCELIK, B., CAPANOGLU, E. 2014. Evaluating the in vitro bioaccessibility of phenolics and antioxidant activity during consumption of dried fruits with nuts. *LWT-Food Science and Technology*. 56(2): 284-289.
- KATZ, D. L., DOUGHTY, K., & ALI, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 15(10):2779-2811.
- KODAD, O., ESTOPAÑÁN, G., JUAN, T., ALONSO, J., ESPIAU, M., and COMPANY, R. 2014. Oil content, fatty acid composition and tocopherol concentration in the Spanish almond genebank collection. *Scientia Horticulturae*. 177: 99-107.
- KOMES, D., BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A., ŠKRABAL, S., VOJVODIĆ, A., & BUŠIĆ, A. 2013. The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. *LWT-Food science and Technology*. 53(1): 360-369.
- KOLEVA-VALKOVA L. Total polyphenol content and antioxidant activity of fresh grape berries, raisins and wine from *vitis vinifera var. alicante bouschet*. *Международная исследовательская организация "Cognitio"*. p. 101-104.
- KOWALSKA, J., SIDORCZUK, A. 2007. Analysis of the effect of technological processing on changes in antioxidant properties of cocoa processed products. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 57(2): 96-99.

- KURTLAR, T. 2011. Badem ilave edilen çikolatalarda antioksidan kapasite değişimlerinin incelenmesi. Thesis doctoral. Istanbul. Istanbul technical university institute of science and technology. 145 p.
- LANGER, S., MARSHALL, L., DAY, A., MORGAN, M. 2011. Flavonols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: a study of the correlation with nonfat cocoa solids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59(15): 8435-8441.
- LEE, E., KUM, J., HWANG, Y., TU, O., JO, H., KIM, J., CHAE, Y. 2012. Comparative study on antioxidant capacities and polyphenolic contents of commercially available cocoa-containing products. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41(10): 1356-136
- LLOPART, E. E., BUSTI, P. A., VERDINI, R. A., DELORENZI, N. J. 2018. Formación de nanocomplejos entre polifenoles de cáscaras de manzanas y beta-lactoglobulina para su potencial aplicación en alimentos funcionales. *Innotec*, (15 ene-jun): 32-36.
- LÓPEZ, A.; FERNANDO, C.; LAZAROVA, Z.; BAÑUELOS, R.; SÁNCHEZ, S. 2012. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista Anacem*. 6(1):48-53.
- MAESTRI, D., MARTÍNEZ, M., BODOIRA, R., ROSSI, Y., OVIEDO, A., PIERANTOZZI, P., TORRES, M. 2015. Variability in almond oil chemical traits from traditional cultivars and native genetic resources from Argentina. *Food chemistry*. 170:55-61.
- MANGAS, S. 2015. Chocolate: Recetas con un toque de felicidad. España. Penguin Random House Grupo Editorial España. 192 p.

- MARTINEZ, A. 2016. Diversificación de la producción de estilbenos en cultivos celulares de vid mediante ingeniería metabólica. Tesis doctoral. Alicante, España. Universidad de Alicante. 172 p.
- MEDEIROS DA SILVA, N., KOSLOWSKY MARDER, R., FARÍAS WOHLBERG, M., FUNCHAL, C., Y DANI, C. (2015). Total phenolic content and antioxidant activity of different types of chocolate, milk, semisweet, dark, and soy, in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of Wistar rats. *Biochemistry research international*. 2015:1-9
- MICHEL-ACEVES, R., IZETA-GUTIÉRREZ, A., FRANCO LIRA, M., MARÍN-BELTRÁN, S., VÁZQUEZ-GALEANA, J., CERDA-REYES, S., CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L. 2017. El chocolate oscuro y los polifenoles nuestros de cada día. *Revista de Sanidad Militar*. 70(1):17-22..
- MNARI, A. B., HARZALLAH, A., AMRI, Z., DHAOU AGUIR, S., & HAMMAMI, M. 2016. Phytochemical content, antioxidant properties, and phenolic profile of tunisian raisin varieties (*Vitis Vinifera* L.). *International Journal of Food Properties*. 19(3), 578-590.
- MOLNAR, T. 2012. Evaluierung der phenolischen inhaltsstoffe und der antioxidativen aktivität von kakao-und schokoladeprodukten aus österreich. Diplomarbeit für Lebensmittelingenieur. Wien, Österreich. Technischen Universität Wien. 118 p.
- MONDRAGÓN-TERÁN, P., GARCÍA-ORTÍZ, L., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S., RAMÍREZ-GARCÍA, S., NÚÑEZ-RAMOS, N. 2014. Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado

- por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 19(4), 446-454.
- MONTILLA, V. 2015. *Aprovisionamiento en restauración*. 5 ed. España. Ed. Elearning, S.L. 396 p.
- NAZARUDDIN, R., SENG, L., HASSAN, O., SAID, M. 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1):87-94.
- NDIFE, J., BOLAJI, P., ATOYEBI, D., UMEZURUIKE, C. 2013. Production and quality evaluation of cocoa products (plain cocoa powder and chocolate). *Am. J. Food. Nutr. Nigeria*. 3(1): 31- 38.
- NTP CODEX STAN 87:2017. 2017. Norma para el chocolate y los productos del chocolate.
- ÖVET, B. 2015. Investigation of antioxidant capacity and phenolic. Thesis doctoral. Turkey. Middle east technical university. 118 p.
- PASCUAL, G., ZAPATA, J. 2010. Sustitución parcial de harina de trigo *Triticum aestivum* L. por harina de kiwicha *Amaranthus caudatus* L., usando el método directo y esponja y masa, en la elaboración de pan. *Rev Soc Quím Perú*. Lima, Peru. 76(4): 377-388.
- PEKER, B., SUNA, S., TAMER, C., COPUR, O. 2013. The effects of lecithin and polyglycerol polyricinoleate (PGPR) on quality of milk, bitter and white chocolates. *J. Agric. Facul. Uludag Univ*. 27(2):55-69.
- PELLIGRINI, N.; RE, R.; YANG, M. y RICE–EVANS, C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts of antioxidant

- activities applying 2,2-azinobis (3-Ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Decolorization Assay. *Methods in Enzymology*. 299:379-391.
- PEREDA M. 2011. Elaboración de sidra natural ecológica, guía práctica para aficionados. Madrid, España. Mundi-Prensa Libros. 191 p.
- QUINTERO R. 2016. Productos básicos agrícolas y desarrollo: producción y comercialización de cacao en Venezuela. Tesis de doctorado. Tenerife. Universidad de La Laguna. 736 p.
- QUIÑONES, M., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, Madrid. 27(1): 76-89.
- QUEVEDO. C. 2016. Valoración financiera de una empresa exportadora de cacao. Tesis de magister en finanzas. Guayaquil, Ecuador. Escuela superior politécnica del litoral. 63 p.
- RADOJCIC, I., DELONGA, K., MAZOR, E., DRAGOVIC-UZELAC, V., CARIC, M., VORKAPIC-FURAC, J. 2009. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech j. Food Sci.* Zagreb, Croacia. 27 (5):330-337.
- RAFECAS, M.; CODONY, R. 2000. Estudio nutricional del cacao y sus derivados. Tesis Nutricionista. Barcelona, España. Universidad de Barcelona. 16. p
- REPO-CARRASCO-VALENCIA, R., HELLSTRÖM, J., PIHLAVA, J., MATTILA, P. 2010. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium*

- pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Food Chemistry. 120(1):128-133.
- RIAÑO, H., CHICA, M., ECHEVERRI, G., AGUIRRE, M., ORTIZ, A., PINEDA, R., OLARTE, N. 2016. Contenido de grasa total, perfil de ácidos grasos y triglicéridos proveniente de cacao finos de aroma: Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela. Vitae, 23: S226.
- RIMBACH G., MELCHIN, M., MOEHRING, J., WAGNER, A. 2009. Polyphenols from cocoa and vascular health a critical review. International journal of molecular sciences. 10(10):4290-4309.
- RODRIGUEZ, V. 2008. Bases de la alimentación humana. Netbiblo. 592 p.
- RUIZ, D., SORIANO, J. 2014. Efecto de la proporción de pasta de cacao (*Theobroma cacao* L) y harina de plátano (*Musa paradisiaca* AAB) en la aceptabilidad general de una mezcla alimenticia. Cientifi-K. 2(2): 33-43.
- SÁNCHEZ, Á., GONZÁLEZ, J., AVALOS, V., DE LA CRUZ, D., CRUZ, J. 2016. Caracterización bromatológica de los productos derivados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Chontalpa, Tabasco, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. (14):2817-2830.
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ANGELES, F., MELCHOR, V., CONDEZO, L. A., LAO, J., MILLER, M. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry. 79(2):207-213.
- SERAFINI, M., BUGIANESI, R., MAIANI, G., VALTUENA, S., SANTIS, S., CROZIER, A., 2003. Plasma antioxidants from chocolate. Nature 424: 1013.

- SEVILLA, J. 2007. La elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica. *Técnica Industrial*. 268: 47-51.
- STEINBERG, F., BEARDEN, M., KEEN, C. 2003. Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *Journal of the American dietetic association*. 103(2): 215-223.
- TABERNERO, M., SERRANO, J., SAURA-CALIXTO, F. 2006. The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. *International Journal of food science and technology*. 41(1):28-32.
- TITTONA, N., SCHUMACHER, A., DANI, C. 2014. Estudo comparativo da quantidade de polifenóis totais e da atividade antioxidante em diferentes chocolates: ao leite, meio amargo, amargo e de soja. *Ciência em movimento*, 16(33): 77-84.
- TODOROVIC, V., REDOVNIKOVIC, I. R., TODOROVIC, Z., JANKOVIC, G., DODEVSKA, M., SOBAJIC, S. 2015. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis*. 41:137-143.
- TORRES, M. 2012. Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro. Tesis doctoral. Reus, España. Universitat rovir i virgili. 70 p.
- TOBERGTE D., CURTIS S. 2013. Segmentation and customer insight in contemporary servicesmarketing practice: Why Grouping Customers Is No Longer Enough. *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(9): 1689–99.

- TROGNITZ, B., CROS E., ASSEMAT, S., DAVRIEUX, F., FORESTIER-CHIRON, N., AYESTAS, E., HERMANN, M. 2013. Diversity of cacao trees in Waslala, Nicaragua: associations between genotype spectra, product quality and yield potential. PLoS One. 8(1):e54079.
- VALENZUELA, A. 2007. El chocolate, un placer saludable. Revista chilena de nutrición. 34(3): 180-190.
- VERTUANI, S., SCALAMBRA, E., VITTORIO, T., BINO, A., MALISARDI, G., BALDISSEROTTO, A., MANFREDINI, S. 2014. Evaluation of antiradical activity of different cocoa and chocolate products: Relation with Lipid and Protein Composition. Journal of medicinal food. 17(4): 512-516.
- VILLEGAS, C., ALBARRACIN, W., CORAL, M. 2016. Extracción de manteca de cacao a partir de dos híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.)/cocoa butter extraction from two hybrids of cocoa (*Theobroma cacao* L.). Vitae. 23: S88.
- YANZAPANTA, A. 2014. Estudio de la variación de los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y grasa en almendras de cacao fino de aroma en tres diferentes zonas de producción de la Amazonia ecuatoriana. Tesis de ingeniero de alimentos. Ambato, Ecuador. Universidad técnica de Ambato. 86 p.
- WAIZEL-HAIAT, S., WAIZEL-BCUAY, J., MAGAÑA-SERRANO, J. A., CAMPOS-BEDOYA, P. y SAN ESTEBAN-SOSA, J. E. 2012. Cacao y chocolate: seduction and therapeutics. Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC. 57(3): 236-245.

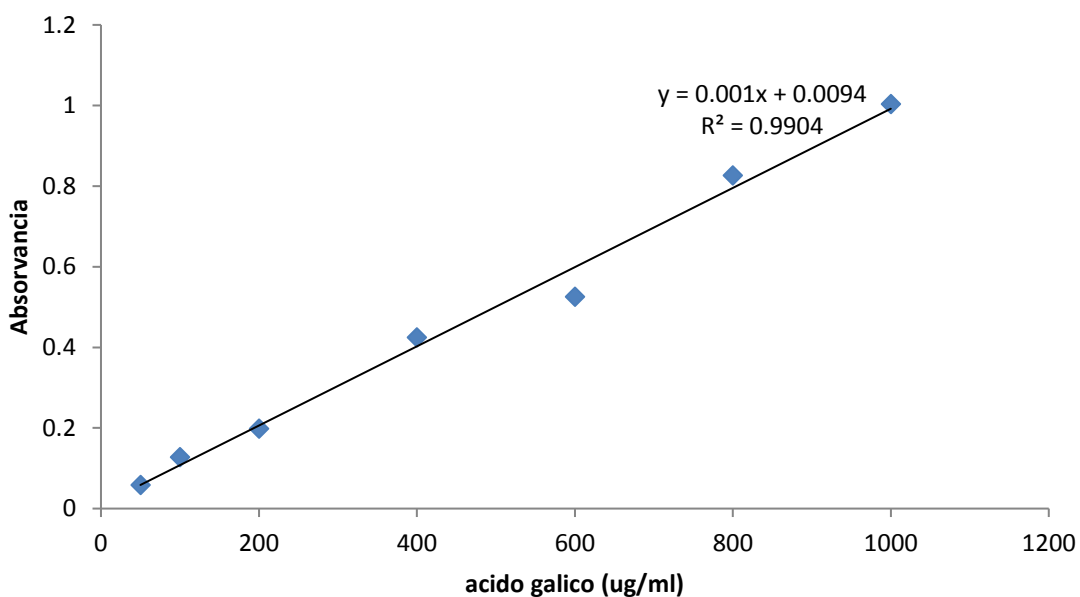
- WOLKE, R. 2005. Lo que Einstein le conto a su cocinero 2. Ediciones robonbook. 432 p.
- WOLLGAST, J., ANKLAM, E. 2000. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?. Food Research International. 33(6):449-459.
- YOO, K, SONG, M, JI, E. 2011. Preparation and sensory characteristics of chocolate with added coffee waste. Korean J. Food & Nutr. 24(1):111-116.
- ZARIĆ, B., PAJIN, B., RAKIN, M., ŠEREŠ, Z., DOKIĆ, L. TOMIĆ, J. 2011 Uticaj sojinog mleka na nutritivna, antioksidativna, reološka i teksturalna svojstva čokolade proizvedene u kugličnom mlinu. Hem. ind. . 65 (5):563–573
- ZINELABIDINE, L. (2014). Pomological and biochemical characterization of almond cultivars in Morocco. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri, 6(6): 743-753.
- ZHU, Y., WILKINSON, K., and WIRTHENSOHN, M. 2015. Lipophilic antioxidant content of almonds (*Prunus dulcis*): a regional and varietal study. Journal of Food Composition and Analysis, Australia. 39: 120-127.
- ZUJKO, M. WITKOWSKA, A. 2014. Antioxidant potential and polyphenol content of beverages, chocolates, nuts and seeds. International Journal of Food Properties. 17(1):86-92.

ANEXO

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

Repeticiones	Concentraciones (ug/ml)						
	1000	800	600	400	200	100	50
1	1,020	0,831	0,520	0,425	0,194	0,133	0,055
2	0,990	0,824	0,529	0,422	0,202	0,124	0,062
3	1,000	0,823	0,527	0,426	0,197	0,125	0,057
Promedio	1,003	0,826	0,525	0,424	0,198	0,127	0,058

A-II. Curva patrón de Ácido gálico.



A-III. Análisis de varianza de la cuantificación de grasa (%)

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	10	1296,458	129,645	1084,88	<0,0001
Error	22	2,629	0,119		**
TOTAL	32	1299,087			
$R^2 = 0,9979$	CV = 1,0121	MSE = 0,3456	Media = 34,154		

A-IV. Análisis de varianza cuantificación de polifenoles (g EAG/100 g muestra)

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	10	119,227	11,9227	1246,60	<0,0001**
Error	22	0,210	0,00956		
TOTAL	32	119,437			

$R^2 = 0,998238$ $CV = 7,5469$ $MSE = 0,09779$ $Media = 1,2958$

A-V. Análisis de varianza cuantificación de IC₅₀ (µg/ml) del radical DPPH

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	10	8745595,607	874559,561	862,53	<0,0001
Error	22	22306,900	1013,950		
TOTAL	32	8767902,507			

$R^2 = 0,9974$ $CV = 4.081022$ $MSE = 31,84258$ $Media = 780,2600$

A-VI. Análisis de varianza cuantificación de IC₅₀ (µg/ml) del radical ABTS^{°+}

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Pr > F
Tratamiento	10	2224182,500	222418,250	780,88	<0,0001
Error	22	6266,298	284,832		
TOTAL	32	2230448,798			

$R^2 = 0,9971$ $CV = 3,81374$ $MSE = 16,8769$ $Media = 442,5303$

A-VII. Análisis de componentes principales en los chocolates comerciales

Matriz de correlacion / coeficiente				
	ABTS	Polifenoles	Grasa	DPPH
ABTS	1			
Polifenoles	-0.64	1		
Grasas	-0.13	0.72	1	
DPPH	0.99	0.6	0.09	1

Matriz de correlacion / probabilidad				
	ABTS	Polifenoles	Grasa	DPPH
ABTS				
Polifenoles	0.0327			
Grasas	0.7042	0.0121		
DPPH	<0.0001	0.0505	0.7914	

Autovalores			
Lambda	Valor	Proporción	Prop. Acumulada
1	2,67	0,67	0,67
2	1,23	0,31	0,98
3	0,09	0,02	1,00
4	0,01	2,4E-3	1,00

Autovectores		
Variables	e¹	e²
Grasa	-0,32	0,75
Polifenoles	-0,55	0,35
DPPH	0,54	0,41
ABTS	0,55	0,37

Correlaciones con las variables originales		
Variables	CP 1	CP 2
Grasa	-0,52	0,84
Polifenoles	-0,89	0,38
DPPH	0,88	0,46
ABTS	0,91	0,42

A-VIII. Descripción de las muestras

Muestra	Marca	Empresa productora	Ubicación de la fabrica	registro sanitario
M1	Triángulo D'Onofrio	Nestlé Perú S.A./AG	Av. Venezuela 2580, (altura cdra. 25 Av. Venezuela) ,Lima, Lima, Lima	G0001110N/NANSPR
M2	Fochis de leche,	Compañía Nacional De Chocolates De Perú S.A	Av. Maquinarias 2360, urb. Conde de las torres ,Lima, Lima, Lima	G0000213N/NACMNC
M3	Milky	La ibérica S.A	Av. Juan Vidaurrazaga M 131, Z.I. Parque industrial ,Arequipa, Arequipa, Arequipa	G0000618N/DAFBDE
M4	Orquídea con leche	Industria Mayo S.A	Jr. Santa Monica 200 , , Tarapoto,San Martin, San Martin	G0004910N/UIARMY
M5	Makao leche	Agroindustria Makao Perú S.A.C	Jr. Cuzco Nro. 402 , ,Pucacaca, Picota, San Martin	G5312311N/UGARID
M6	Sublime	Nestlé Perú S.A./AG	Av. Venezuela 2580, (Altura Cdra. 25 Av. Venezuela) , Lima, Lima, Lima	G1001812N/NKMCPD
M7	Fochis con pasas	Compañía Nacional de Chocolates de Perú S.A	Av. Maquinarias 2360, urb. Conde de las torres ,Lima, Lima, Lima	G6351611N/NACMNC
M8	Orquídea con leche y kiwicha	Industria Mayo S.A	Jr. Santa Monica 200 , , Tarapoto,San Martin, San Martin	G223510N/UIARMY
M9	Orquídea con leche y pecana	Industria Mayo S.A	Jr. Santa Monica 200 , , Tarapoto,San Martin, San Martin	G1000213N/UIIDMY
M10	Exotic almendras	Exotic Chocolatier S.A.C.	Jr. Plaza mayor Nro. 195 , Tarapoto,San Martin, San Martin	G6450812N/UIEOCO
M11	Comincacao	Comercial Industrial de cacao	Carr. Fernando Belaunde Terry KM. 1.5 , , Juanjui, Mariscal Cáceres, San Martin	G9450115N/UFCMID