

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA

DE ALIMENTOS



POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS,

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EVALUACIÓN

SENSORIAL EN GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CRIOLLO Y CCN-51 CON Y SIN BENEFICIO

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

REYES PAZ, FREZIA NELLY

PROMOCIÓN 2011 - I

Tingo María - Perú

2014



Q52

R47

Reyes Paz, Frezia Nelly

Polifenoles Totales, Antocianinas, Capacidad Antioxidante y Evaluación Sensorial en Granos de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Criollo y CCN-51 con y sin Beneficio - 2014

78 páginas; 09 cuadros; 18 figuras; 97 ref.; 30 cm.

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

- | | | |
|-------------------------|------------------------------|------------------------|
| 1. CACAO | 2. POLIFENOLES | 3. ANTOCIANINAS |
| 4. ANTIOXIDANTES | 5. ANALISIS SENSORIAL | |



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

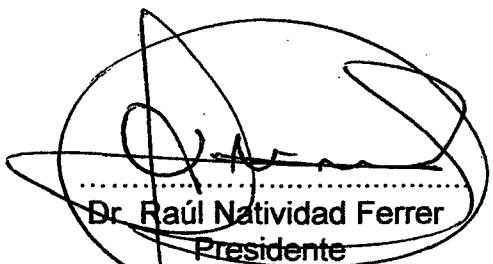
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 008-2014

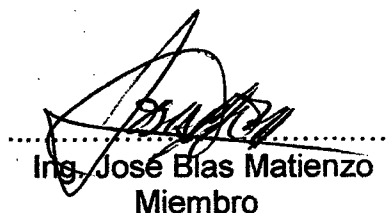
Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 26 de agosto de 2014, a horas 5:00 p.m. en la Sala de Grados de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo María, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco, para calificar la tesis presentada por la Bach. **REYES PAZ, Frezia Nelly**, titulada:

“POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EVALUACION SENSORIAL EN GRANOS DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) CRIOLLO Y CCN-51 CON Y SIN BENEFICIO”

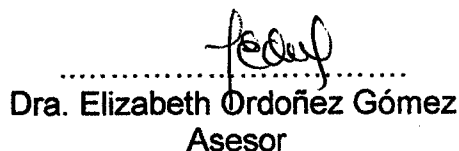
Después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran **APROBADO** con el calificativo de **BUENO**; en consecuencia la Bachiller, queda apta para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 45° de la Ley Universitaria 30220; los artículos 51° y 52° del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 03 de setiembre de 2014


.....
Dr. Raúl Natividad Ferrer
Presidente


.....
Ing. José Blas Matienzo
Miembro


.....
Ing. Luz M. Follegatti Romero
Miembro


.....
Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez
Asesor

DEDICADO

A DIOS:

Por permitirme ver la luz del sol cada día y darme la oportunidad de ser mejor, por estar siempre conmigo aunque a veces me aleje de él.

A MI HERMANA:

FIGURELLA MARINA REYES PAZ, por darme hasta ahora los mejores regalos que son mis preciosos sobrinos, por sus consejos, amor, comprensión y ser mi confidente en todo momento.

A MIS PADRES:

DANIEL REYES VALDIVIA y MARIA NELLY PAZ MONTALDO, por el gran esfuerzo que han hecho para poder cumplir mis metas, por confiar en mí, por su amor, comprensión, apoyo y enseñarme los valores para poder ser una persona de bien, y así forjar mi camino.

A MI ENAMORADO:

CARLOS DIAN TRELLES NOCHE, por su amor, apoyo, aliento y comprensión brindado en cada momento bueno y malo que hemos pasado juntos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por ser el alma mater, en donde culminé mi carrera y donde viví muchos momentos inolvidables.

A mi asesora la Dra. Elizabeth Ordoñez Gómez, por todo el apoyo, paciencia, enseñanza y dedicación a la investigación.

A toda mi familia, por estar siempre a mi lado apoyándome, aconsejando, por todo el amor que me dan y estar siempre cuando más los necesito.

Al Ing. Darlym Reategui, Ing. Mey Choy, Ing. Zara Saavedra y al Ing. Davy Hidalgo, por su conocimiento, apoyo, amistad y buen humor brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Al Ing. Demetrio Lama y al Ing. Mendis Paredes por las muestras brandadas para la ejecución de este proyecto, por su conocimiento y apoyo incondicional.

A mis amigos: Orfita por su amistad, compañía y los ánimos que me dio en todo momento, Vicky Tello, porque a pesar de que nuestras vidas tomaron distintos rumbos siempre esta cuando más la necesito, Evil, por su apoyo en el laboratorio. Carla, Saulo, Noemy, Lucy, Vicky Peña, Carolina, Jambo, Jork, Carolina, Saul, Ritaly, Ronal ...y todos aquellos que de alguna manera me apoyaron para la culminación de esta meta, de una u otra manera formaron parte de las alegrías y tristezas que viví durante esta etapa de la carrera profesional.

INDICE

| | Página |
|--|---------------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1. Generalidades del cacao | 3 |
| 2.1.1. Definición del cacao | 3 |
| 2.1.2. Variedades | 4 |
| 2.1.3. Composición química y valor nutricional del cacao | 7 |
| 2.2. Beneficio del cacao..... | 8 |
| 2.3. Generalidades de los polifenoles | 11 |
| 2.3.1. Definición | 11 |
| 2.3.2. Estructura y clasificación..... | 12 |
| 2.3.3. Polifenoles en cacao | 13 |
| 2.4. Generalidades de las antocianinas..... | 14 |
| 2.4.1. Definición | 14 |
| 2.4.2. Estructura química de las antocianinas..... | 15 |
| 2.4.3. Estabilidad de las antocianinas | 17 |
| 2.5. Generalidades de los antioxidantes | 17 |
| 2.5.1. Definición | 17 |
| 2.5.2. Tipos de antioxidantes | 19 |
| 2.5.3. Radicales libres..... | 20 |
| 2.5.4. Pro-radical..... | 20 |
| 2.5.5. Métodos de evaluación | 22 |
| 2.6. Evaluación sensorial..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 3.1. Lugar de ejecución..... | 25 |
| 3.2. Materia prima | 25 |
| 3.3. Equipos, materiales y reactivos | 26 |
| 3.3.1. Equipos de laboratorio | 26 |
| 3.3.2. Materiales de laboratorio..... | 26 |
| 3.3.3. Reactivos y solventes..... | 27 |
| 3.4. Métodos de análisis | 27 |
| 3.5. Metodología experimental..... | 28 |
| 3.5.1. Obtención de la muestra | 28 |
| 3.5.2. Preparación de extractos | 30 |
| 3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en los granos cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 31 |
| 3.5.4. Cuantificación de antocianinas en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 33 |
| 3.5.5. Determinación de la capacidad antioxidante en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio | 35 |
| 3.5.6. Evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 40 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 42 |
| 4.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio | 42 |
| 4.1.1. Determinación de la curva estándar..... | 42 |

| | |
|---|----|
| 4.1.2. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 | 43 |
| 4.2. Cuantificación de antocianinas en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio | 51 |
| 4.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao criollo y CCN-51..... | 59 |
| 4.3.1. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 1,1- diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH)..... | 59 |
| 4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 2,2- azinobis (3-etilbenzotiazolino - 6- ácido sulfónico) (ABTS ^{o+}) | 65 |
| 4.4. Evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 70 |
| V. CONCLUSIONES..... | 76 |
| VI. RECOMENDACIONES | 77 |
| VII. ABSTRACT | 78 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 80 |
| IX. ANEXO..... | 94 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Mazorca madura de cacao criollo..... | 5 |
| 2 | Mazorcas maduras de cacao CCN-51..... | 6 |
| 3 | Estructura química de los polifenoles..... | 13 |
| 4 | Estructura de la antocianina | 16 |
| 5 | Flujograma de operaciones para la obtención de las muestras de cacao criollo y CCN-51..... | 29 |
| 6 | Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao..... | 31 |
| 7 | Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 33 |
| 8 | Esquema experimental para la cuantificación de antocianinas | 34 |
| 9 | Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en cacao criollo y CCN-51 con DPPH..... | 37 |
| 10 | Esquema experimental para la determinación de la actividad antioxidante (radical ABTS ^{o+}) de cacao criollo y CCN-51..... | 39 |
| 11 | Esquema experimental para la evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 41 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 12 | Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles..... | 43 |
| 13 | Representación del contenido de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 47 |
| 14 | Representación del contenido de antocianinas en cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 55 |
| 15 | Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 63 |
| 16 | Comportamiento del IC ₅₀ frente al radical ABTS en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 67 |
| 17 | Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial en granos cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 71 |
| 18 | Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de granos cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 74 |

INDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Composición química de las almendras de cacao (porcentaje peso fresco)..... | 7 |
| 2 | Partes sustituibles de las antocianinas..... | 16 |
| 3 | Preparación de las diluciones de trabajo para el radical DPPH en muestras de cacao o criollo y CCN-51 con y sin beneficio | 36 |
| 4 | Preparación de las diluciones de trabajo para el radical ABTS°+ en muestras de cacao o criollo y CCN-51 con y sin beneficio | 38 |
| 5 | Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g)..... | 42 |
| 6 | Cuantificación de polifenoles totales de granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 47 |
| 7 | Cuantificación de antocianinas de granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio | 55 |
| 8 | Resultados del IC ₅₀ del radical DPPH de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 63 |
| 9 | Resultados del IC ₅₀ del radical ABTS°+ de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio..... | 67 |

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del CIPNA y CIDBAM - UNAS. Los objetivos fueron: cuantificar polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante mediante los radicales libres DPPH y ABTS^{o+} y análisis sensorial en los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio. Para el análisis de las muestras se preparó un extracto hidroalcohólico. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial (2x7x3), y la prueba de Tukey ($p < 0,05$), para la evaluación sensorial se utilizó el análisis multivariado con componentes principales. Los granos de cacao CCN-51 fresco sin fermentar presentaron mayor contenido de polifenoles totales $9,19 \pm 0,015$ gEAG/100g y el menor fue para los granos criollo fermentados 6 días y secados 5 días $6,01 \pm 0,007$ gEAG/100g. El mayor contenido de antocianinas granos de cacao CCN-51 fresco sin fermentar $5,639 \pm 0,016$ y el menor criollo fermentado 6 días y secado 5 días $0,946 \pm 0,008$ mg cianidina-3-glucósido/g. La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS presento CCN-51 fresco no fermentado $IC_{50} 35,557 \pm 0,086$ μ g/mL y $IC_{50} 30,101 \pm 0,061$ μ g/mL y el menor fue criollo fermentado 6 días y secado 5 días $IC_{50} 53,587 \pm 0,105$ μ g/mL y $IC_{50} 39,667 \pm 0,133$ μ g/mL. En la evaluación sensorial se encontró dos grupos (criollo y CCN-51 fermentado 6 días y secado 5 días) predominó las características a cacao, floral, panela, nueces y afrutado, el segundo (criollo y CCN-51 fresco, criollo y CCN-51 fresco secado 5 días) predominando las características de ácido, astringente, amargo y crudo.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de cacao en el Perú hasta la década de los ochenta e inicios de los noventa fue favorable para el productor cacaotero pues la selva peruana especialmente en el valle del Alto Huallaga presenta una gran diversidad genética. El cacao es uno de los cultivos con mayor potencial, por las condiciones edafoclimáticas, además es uno de los cultivos agrícolas más importantes en el país por su calidad, convirtiéndolo en un producto muy cotizado en el mercado mundial.

En los granos de cacao la fermentación es muy importante para desarrollar las características organolépticas deseadas en los productos de chocolatería. Por otra parte el consumo de nibs de cacao sin fermentar se viene incrementando debido que en la fermentación se pierden la mayoría de compuestos polifenólicos como el flavan - 3 -ol (flavonol), que tienen actividad antioxidante significativa, asociándose, así con beneficios para la salud a corto y largo plazo por sus propiedades terapéuticas que influyen favorablemente en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares e incluso en otras patologías como el cáncer.

Para garantizar la calidad del grano de cacao y un buen resultado en los productos de chocolatería, se elaboran productos mezclando la pasta de los granos de cacao fermentados que presentan las características

organolépticas deseadas con los nibs de cacao sin fermentar que aporta antioxidantes requeridos para la salud, obteniendo así un producto más completo con un agradable sabor y beneficioso para la salud de allí el interés despertado para realizar la investigación, planteándose los siguientes objetivos:

- Cuantificar polifenoles totales en los granos de cacao con y sin beneficio.
- Evaluar el contenido de antocianinas en los granos de cacao con y sin beneficio.
- Evaluar la capacidad antioxidante mediante los radicales DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino - 6- ácido sulfónico)) en los granos de cacao con y sin beneficio.
- Realizar el análisis sensorial de los granos de cacao con y sin beneficio.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del cacao

2.1.1. Definición del cacao

El cacao es una planta tropical que crece en climas cálidos y húmedos, se presume que es originario de la Amazonía (bosques tropicales de América del Sur), y que más tarde se extendió a América Central (RIMACHE, 2008). El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una de las 22 especies que constituyen el género *Theobroma*, la misma que es nativo del nuevo mundo, su centro de origen está en la cuenca del Amazonas y el Orinoco (WOOD, 1973).

MEURSING (2008) menciona que el árbol del cacao original, creció hasta una altura de 10 metros en la madurez y prefiere la sombra de otros árboles más grandes, métodos de mejoramiento modernos han llevado al desarrollo de los árboles de un estándar de 3 metros de altura para permitir una fácil cosecha manual.

ÁNGEL (2010) indica que la legislación española y europea definen los granos de cacao como las semillas de plantas tropicales fermentadas y secadas, de la familia esterculiacéa. GONZALES (2007) dice que las almendras del cacao, constituyen el insumo básico para la industria del chocolate, sus derivados, la industria cosmética y farmacéutica.

2.1.2. Variedades

De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura de las plantas cultivadas, el término variedad es el mismo que cultivar, que aplicado a un conjunto de individuos que muestran diferencias genéticas pero que tienen una a más características por las cuales pueden ser diferenciados de otros cultivares (ENRÍQUEZ, 1985).

RIMACHE (2008) indica que existen tres variedades de árboles de cacao, la más conocida es la variedad Forastero, representa un 90% del cacao producido en el mundo, se encuentra en África del Oeste y Brasil (en Perú en el alto y bajo Amazonas), el segundo es el Criollo, que produce "cacao fino y aromático", cultivado principalmente en el Caribe, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y por último el Trinitario que es un cruce entre el Criollo y el Forastero.

GONZÁLEZ *et al.* (2012) manifiesta que cada variedad de cacao viene con características propias que contribuyen al aroma y sabor del chocolate producido a partir de ella. MEURSING (2008) menciona que los atributos típicos de los granos, como el tamaño del grano, sabor, color y composición química varían considerablemente según las variedades.

- Criollo

Los criollos son árboles relativamente bajos, menos robustos respecto de otras variedades, su copa es redonda con hojas pequeñas, gruesas, ovaladas y color verde claro, las almendras son de color blanco, se cultivan principalmente en América Central, México, Colombia y parte de

Venezuela y son susceptibles a las enfermedades (CAMPOVERDE, 2010). Este tipo de cacao se caracteriza por tener mazorcas de coloraciones verdes y rojizas en estado inmaduro (GUILLIN y LARA, 2010).

RIMACHE (2008) y ENRÍQUEZ (1985), mencionan que los cacaos criollos presentan mazorcas cilíndricas de color rojo o amarillo cuando maduran, tienen 10 surcos profundos, rugosas y conspicuamente punteadas, las paredes de las mazorcas son relativamente delgadas y fáciles de cortar, las semillas son rollizas, casi redonda y los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido.

El cacao criollo tiene cotiledones pardos y un sabor suave a nuez, estos granos son susceptibles a las enfermedades y producen bajos rendimientos, se caracteriza por la amargura leve (pero no desagradable), la astringencia leve y finos aromas (GONZÁLEZ *et al.*, 2012 y MEURSING, 2008).



Figura 1. Mazorca madura de cacao criollo

- CCN51

El cacao CCN51 (Colección Castro Naranjal) (figura 2) es producto de la investigación realizada en el Ecuador, en la zona de Naranjal, por el agrónomo Homero Castro, el clon número 51 es la que obtuvo éxito y brindó las características requeridas, este clon presenta características de alta producción y tolerancia a las enfermedades pero no tiene el aroma que posee el criollo (GUILLIN y LARA, 2010).

Planta de 5 a 6 m de altura, con 3 a 4 raíces principales, posee un tallo de donde emergen las ramas, las hojas son grandes de color verde oscuro; sus flores son hermafroditas, es decir, tienen tanto gametos masculinos como femeninos, el fruto es una baya, que se conoce como mazorca y se encuentran distribuidas desde la parte basal hasta la parte superior del árbol, la mazorca es de color rojo con contenido alto de mucílago, generalmente contienen en su interior de 35 a 45 granos de forma aplanada, de 2 a 4 cm de longitud, recubiertos por pulpa dulce y ligeramente ácida (CAMPOVERDE, 2010).



Figura 2. Mazorcas maduras de cacao CCN-51

El clon CCN51 tiene buen rendimiento y resistencia a las enfermedades fungoideas comunes, haciéndole una alternativa aceptable también puede competir en los mercados exigentes en lo que se refiere a la calidad, con un manejo pos cosecha y una buena fermentación alcanza rendimientos sobre 4,000 kg de grano seco/Ha (ESPINOSA *et al.*, 2006).

2.1.3. Composición química y valor nutricional del cacao

La composición química varía de acuerdo a la variedad y otros factores (suelo, condiciones climáticas, etc.), tal como se presenta en el siguiente cuadro.

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

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

Fuente: SULLCA (1992).

2.2. Beneficio del cacao

Cosecha: Corresponde a la recolección de las mazorcas teniendo en cuenta la madurez, las características más típicas para conocer la mazorca madura es su cambio de color (MORENO y SANCHEZ, 1989 y RIMACHE, 2008).

ARMIJOS (2002) el criterio para el grado de madurez es la coloración de la mazorca que depende de la variedad o clon cultivado, no se deben cosechar las mazorcas inmaduras ya que los contenidos de azúcares pueden no ser suficientes para obtener una fermentación satisfactoria.

Quiebra: Según ARÉVALO (2004) la quiebra es la segunda etapa del beneficio que consiste en partir la mazorca transversal o diagonalmente con un golpe de machete procurando no cortar las semillas y extraer los granos de la placenta. Esto debe realizarse antes de los 5 días después de la cosecha pero ENRÍQUEZ (1985) nos dice que se debe hacer después de la recolección de manera que se pueda reunir en un mismo día la masa suficiente de almendras para una fermentación homogénea (RIMACHE, 2008 y ARMIJOS, 2002).

Fermentación: Es el proceso que continua después del desgrane, consiste en acumular los granos un período de tiempo con el fin de que los microorganismos descompongan el mucílago (la pulpa blanca y azucarada que envuelve los granos), aumenta la temperatura para la muerte del embrión y se inicien los cambios bioquímicos y las reacciones enzimáticas en el interior de las almendras, este proceso facilita además el secado de los granos (CUBILLOS *et al.*, 2008).

Elimina la pulpa y mejora los caracteres organoléptico del grano, se colocan las semillas frescas en un cajón de por lo menos 1 m² y 0,8 m de alto, se debe nivelar la masa en el cajón, se cubre con hojas de plátanos, sacos de yute con el fin de reducir la radiación reteniendo calor desarrollado y la humedad, ésta cubierta debe estar hasta el fin de la fermentación (RIMACHE, 2008).

GUILLIN y LARA (2010) mencionan que el efecto de la fermentación en la calidad del cacao es importante y tiene doble finalidad: primero, que la pulpa se convierte en ácido acético, la semilla se hincha y luego se evapora y segundo, reducir el amargor y la astringencia, para posteriormente desarrollar los precursores del sabor y aroma en los granos de cacao. Por otro lado ENRÍQUEZ (1985), SÁNCHEZ (2007) y ARMIJOS (2002) manifiestan que el proceso bioquímico interno de la fermentación que destruye las células pigmentadas, transforma el sabor astringente desarrollando los sabores y aromas característicos a chocolate.

- Fermentación anaerobia: La fermentación alcohólica que se inicia ni bien se abren las mazorcas y se extraen las almendras, alcanzando su punto máximo a las 48h y su máxima actividad depende de la temperatura que pueda alcanzar, termina la fermentación al consumirse la mayoría de los azúcares (ENRÍQUEZ, 1985).

Los precursores nitrogenados de aroma formados durante la fase anaerobia, están dominados por los aminoácidos y péptidos disponibles por reacciones de condensación, amino-carbonilo, no oxidativas promovidas en las

fases de temperatura elevada, bajo condiciones anaerobias (GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

- Fermentación aerobia: Se realiza en presencia de oxígeno molecular, también comienza la fermentación acética donde el aumento del etanol y la mejor aireación facilita la proliferación de las bacterias del ácido acético (cetonas y acetobacter), las cuales convierten el etanol en ácido acético (GUILLIN y LARA, 2010). Los microorganismos producen ácido acético y etanol que migran lentamente al grano causando el hinchamiento que inhibe la germinación y contribuye a los cambios estructurales, eliminando el compartimiento de enzimas – sustratos (GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

Secado: La etapa de secado se debe iniciar inmediatamente después de la fermentación para prevenir el crecimiento de hongos que pueden conferir sabor desagradable para el producto final o producir toxinas dañinas para la salud (EFRAIM *et al.*, 2009). Al secar se elimina una gran parte de la humedad del grano para que pueda ser conservado y continúa su fermentación interna, disminuye el amargor y el desarrollo del aroma, la aplicación de calor debe darse a una capa delgada y constantemente removida para que la superficie de evaporación sea grande y el secado homogéneo, eliminar la pulpa restante, dar pulimiento al grano (RIMACHE, 2008). Se debe secar los granos hasta quedar a un 7% de humedad para que continúen algunas reacciones bioquímicas que finalmente producirán los precursores del sabor, si pasa el 8% es propenso a

enmohecerse y si baja del 6%, los granos se vuelven frágiles y quebradizos (CUBILLOS *et al.*, 2008 y ENRÍQUEZ, 1985).

Almacenamiento: El almacenamiento debe ser en una sala techada, alejada de la influencia de humedad, debe disponer de ventilación bien distribuida y el ambiente donde se almacena debe estar exento de olores extraños, como los provenientes de pesticidas, combustibles, alimentos con olores penetrantes, entre otros, no debe haber presencia de cualquier tipo de plagas (MORENO y SANCHEZ, 1989 y ENRÍQUEZ, 1985).

Los granos son envasados en costales de yute y si todavía están calientes producto del secado, se deja enfriar al aire libre antes de ensacarlos (RIMACHE, 2008).

2.3. Generalidades de los polifenoles

2.3.1. Definición

RAMÍREZ *et al.* (2013) y KUSKOSQUI *et al.* (2004) nos dicen que los frutos, en adición a los nutrientes esenciales y a una serie de micronutrientes tales como minerales, fibras y vitaminas, aportan además diversos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica que se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno, denominados polifenoles que también se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal. Los compuestos polifenólicos, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, estos se caracterizan por la presencia de más de un grupo de fenol por molécula, estas moléculas son importantes para la fisiología

de las plantas porque contribuyen a la resistencia al ataque de microorganismos, insectos y ayudan a preservar su integridad debido a su exposición a los ambientes estresantes incluyendo radiaciones ultravioleta y temperaturas relativamente altas (ZHAO *et al.*, 1999).

La actividad antioxidante de los polifenoles se debe principalmente a sus propiedades redox el cual les permite actuar como agentes reductores, debido a que son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides y secuestradores de oxígeno; su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones además de tener potencial para quelar metales (KUSKOSKI, 2004 y KOHKONEN *et al.*, 1999).

2.3.2. Estructura y clasificación

Los polifenoles se caracterizan por contener un anillo aromático unido a dos o más grupos hidroxilo (grupo fenol), la estructura de los polifenoles varía de moléculas simples, como los ácidos fenólicos, a estructuras complejas, como los taninos condensados (figura 3); se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (UGARTONDO, 2009).

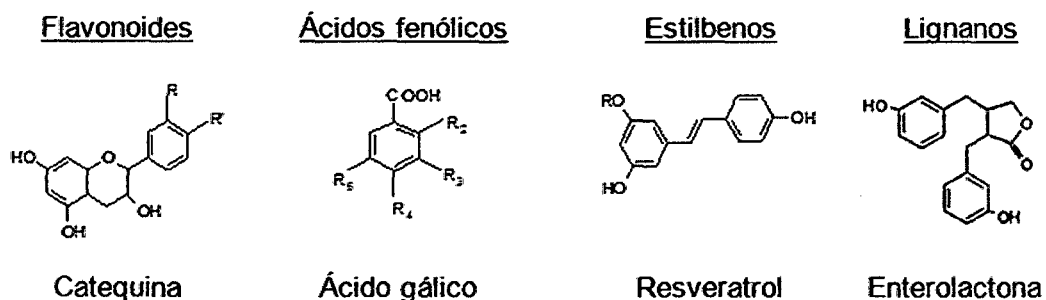


Figura 3. Estructura química de los polifenoles.

Se pueden distinguir dos grandes grupos los no flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos, taninos hidrolizables) y los flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, antocianos, flavanonas, taninos condensados) (MANACH *et al.*, 2005).

El consumo de alimentos con contenidos altos de polifenoles se relacionan con la inhibición y prevención de procesos patológicos que llevan al desarrollo de enfermedades como los desórdenes autoinmunes o cáncer, los polifenoles de interés en el cacao son los del grupo de flavonoides, como las catequinas (37%), antocianinas (4%) y procianidinas (58%) (NEGARESH y MARÍN, 2013 y HILL *et al.*, 2009).

2.3.3. Polifenoles en cacao

Los polifenoles en los granos de cacao son almacenados en las células pigmentarias de los cotiledones, y le aportan colores que van desde el blanco hasta un morado oscuro (ZAPATA *et al.* 2013), en la semilla de cacao los polifenoles se encuentran en la cascara y en el cotiledón, el cual se caracteriza por el color violeta intenso, color relacionado con polifenoles

específicos como las catequinas y antocianinas (SUAZO, 2012), entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos como el ácido cumárico, la quercetina y los taninos; flavonoides como las procianidinas, antocianinas, aunque el más activo biológicamente es la epicatequina; además de las flavononas y flavonol glicosídicos (RAMÍREZ *et al.*, 2013), el cacao y sus productos son alimentos ricos en polifenoles como catequinas (epicatequina, epigallocatequina, galocatequina y catequina), además de otros flavonoides como las procianidinas, antocianinas, flavononas y flavonol glicosídicos (PEREA-VILLAMIL *et al.*, 2009).

2.4. Generalidades de las antocianinas

2.4.1. Definición

Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, violeta, hidrosolubles visibles al ojo humano, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, químicamente las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, uniéndosele un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico, la estructura química básica de estas agliconas es un núcleo de flavon y el ión flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B), el flavilio normalmente funciona como un catión (POO, 2005 y AGUILERA *et al.*, 2011).

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, nombres que derivan de la fuente

vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas (BADUI, 1999). Los antocianos, también conocidos como antocianinas son los principales responsables del color característico de las frutas rojas y vinos tintos (RAMIREZ *et al.*, 2009). Las antocianinas, presentan una estructura química adecuada para actuar como agentes antioxidantes, donar hidrógenos o electrones a los radicales libres, así como capturarlos y desplazados en su estructura aromática (HEIM *et al.*, 2002).

2.4.2. Estructura química de las antocianinas

Las antocianinas, pigmentos flavonólicos, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazados en su estructura aromática, la actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado; los grupos hidroxilos libres en las posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 son donadores de electrones (figura 4) (KUSKOSQUI *et al.*, 2004).

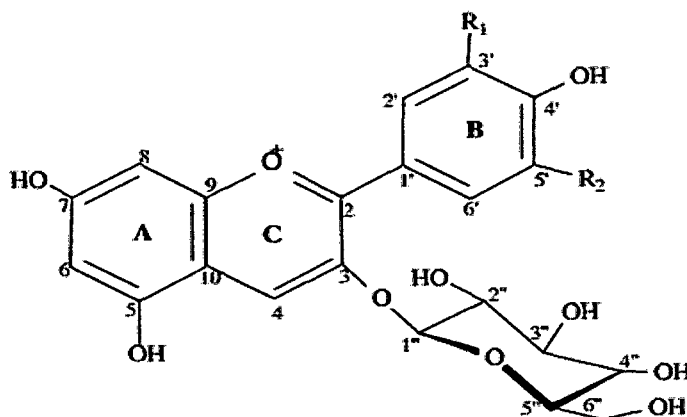


Figura 4. Estructura de la antocianina

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio, por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación de los rojos; también cambian de color cuando forman complejos con otros compuestos fenólicos (proantocianidinas, catequinas, taninos y flavonoides) o con algunos polisacáridos, ya que se favorece un desplazamiento de la absorción a longitudes de onda mayor (BADUI, 1999).

Cuadro 2. Partes sustituibles de las antocianinas.

| Aglicona | Sustitución | | λ max (nm) |
|---------------|------------------|------------------|--------------------|
| | R1 | R2 | espectro visible |
| Pelargonidina | H | H | 494 (naranja) |
| Cianidina | OH | H | 506 (naranja-rojo) |
| Delfinidina | OH | OH | 508 (azul-rojo) |
| Peonidina | OCH ₃ | H | 506 (naranja-rojo) |
| Petunidina | OCH ₃ | OH | 508 (azul-rojo) |
| Malvidina | OCH ₃ | OCH ₃ | 510 (azul-rojo) |

Fuente: CONDEZO, 2011.

2.4.3. Estabilidad de las antocianinas

Según FENNEMA (1993) el núcleo flavilio de los pigmentos de antocianina es deficiente en electrones, por tanto, muy reactivo, las reacciones ordinariamente comprenden la decoloración de los pigmentos.

Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio (POO, 2005). Dada su alta hidrosolubilidad, estos pigmentos se pueden perder fácilmente por lixiviación en el agua que se utiliza en los diferentes tratamientos; a medida que aumenta la temperatura se acelera la decoloración de la fruta, ya que se favorece tanto la extracción que incluso se puede llegar a obtener productos prácticamente incoloros (BADUI, 1999).

2.5. Generalidades de los antioxidantes

2.5.1. Definición

Se puede definir como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de este sustrato; el antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, se debilita su acción y en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes; no todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan a su vez reacciones con los radicales libres (GARCÍA *et al.*, 2001 y AVELLO y SUWALSKY, 2006).

CADENA y HERRERA (2008), nos dicen que estos compuestos se han dividido por conveniencia en tres clases:

- Enzimático o no enzimático: según su naturaleza química.
- Primarios, secundarios o terciarios: según su función.
- Endógenos o exógenos: en dependencia de que sean sintetizados por la célula o ingresen a través de la cadena alimenticia.

La actividad antioxidante, consecuencia de la presencia y estructura química de los polifenoles, ha centrado interés en los posibles efectos beneficiosos para la salud, protegiendo el organismo de los radicales libres, moléculas altamente reactivas que pueden dañar el organismo a nivel celular, este daño producido por los radicales libres puede aumentar el riesgo al desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades degenerativas; los antioxidantes desactivan los radicales libres, minimizando el daño y protegiendo el organismo de este tipo de enfermedades (PADILLA *et al.*, 2008).

AIKPOKPODION y DONGO (2010) indica que la capacidad antioxidante está dado por los polifenoles totales, monómero flavonol (epicatequina y catequina) y proantocianinas. BACELAR *et al.* (2013) mencionan que cuando una planta es atacada por un potencial patógeno, hay una activación de la defensa complejo de respuestas, con la expresión de diversos genes, lo que resulta en la síntesis y la acumulación de metabolitos secundarios, tales como compuestos fenólicos.

2.5.2. Tipos de antioxidantes

- **Exógeno:** Los antioxidantes endógenos o antioxidantes enzimáticos, actúan a nivel celular ingresando a través de la cadena alimentaria y son encontrados en nuestra flora, existe tres sistemas principales de enzimas antioxidantes: 1) Superóxido dismutasa (SOD), 2) Catalasa (CTL) y 3) Glutación peroxidasa (GPX) (GARCÍA *et al.*, 2001).

- **Endógeno:** Los que son sintetizados por la célula transformando los radicales libres en menos agresivos, entre ellos tenemos: flavonoides, alfa tocoferol (vitamina E), beta caroteno, vitamina C, glutación y urato (GARCÍA *et al.*, 2001).

- **Naturales:** El término alude a aquella sustancia, con propiedades antioxidantes, que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y los animales (IGLESIAS, 2009). Los más conocidos son: vitamina C, vitamina E, beta-carotenos, flavonoides y zinc, en los últimos años se ha promovido el uso de antioxidantes naturales (CADENA y HERRERA, 2008).

- **Sintéticos:** Los más usados son el butilhidroxi anisol (BHA), butilhidroxi tolueno (BHT), terbutil hidroquinona (TBHQ) y los galatos, son ampliamente utilizados en la industria de alimentos, BHA y BHT son muy efectivos en grasas animales y menos en grasas y aceites vegetales; se ha demostrado que estos dos compuestos son sinérgicos entre sí, los antioxidantes sintéticos son altamente efectivos y económicos, su empleo es cuestionado por efectos adversos a la salud (IGLESIAS, 2009 y CADENA y HERRERA, 2008).

2.5.3. Radicales libres

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células; la vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos; los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (AVELLO y SUWALSKY, 2006 y UGARTONDO, 2009).

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía liberan radicales libres, lo que es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estas especies, esta defensa se realiza a través de los antioxidantes (GARCÍA *et al.*, 2001).

2.5.4. Pro-radical

De acuerdo al principal tipo de átomo del cual provienen, los radicales libres se clasifican en especies reactivas derivadas del oxígeno y especies reactivas derivadas del nitrógeno (GUTIÉRREZ, 2006).

- Tipos de radicales

Según QUINTANAR y CALDERON (2009) los radicales libres de importancia biológica pueden clasificarse como:

- **Especies reactivas de oxígeno (ERO):** Son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al organismo mediante reacciones bioquímicas de óxido-reducción, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por factores patológicos, las principales son el oxígeno molecular (O_2), el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (O_2^1), así como las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas; esto es, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperoxilo (HO_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estas especies son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 y son más reactivos que el O_2 en su estado basal. El peróxido de hidrógeno, no es un radical libre pero está estrechamente relacionado con la producción de radicales porque es el principal precursor del radical hidroxilo.

- **Metales de transición:** los elementos del primer periodo de la serie "d" de la tabla periódica (Fe, Mn, Co, Ni y Cu) pertenecen a los llamados metales de transición, tienen la característica de llegar a ser estables por si mismos sin necesidad de reaccionar con otro elemento, esto es, cuando a su último nivel de energía le faltan electrones para estar completo los utiliza de los niveles o subniveles internos, con lo cual logra su estabilidad, la falta de electrones en el nivel de donde los transfirió se compensa con otros electrones de otro nivel o subnivel, y así sucesivamente: a este fenómeno se le llama transición electrónica. La mayoría de los metales de transición tienen electrones

desapareados y precisamente gracias a esta transición pueden existir en forma de radical libre.

- **Otros radicales libres:** Entre los que se encuentran los radicales libres de nitrógeno; tales como, el óxido nítrico (NO^\bullet) y el dióxido nítrico (NO_2^\bullet). El NO^\bullet es un radical muy reactivo y de importancia fisiológica puede oxidar y dañar, pero es esencial en funciones biológicas complejas como son la neurotransmisión y neuroregulación del sistema nervioso. Estos tipos de ERN son capaces de generar daño oxidativo y muerte celular. Existen otros radicales libres que tienen diferente naturaleza como el ion hipoclorito (ClO^\bullet) y el radical triclorometilo (CCl_3^\bullet) este último producido durante el metabolismo del CCl_4 por el citocromo. La reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es variable pero siempre elevada y de baja especificidad. Diferentes radicales y especies reactivas tienen diferentes vidas medias, siempre muy bajas, pero algunas de ellas suficientes para permitir que algunas moléculas puedan difundir y actuar en orgánulos o células vecinas, tal es el caso del H_2O_2 y del NO^\bullet .

2.5.5. Métodos de evaluación

- Radical 1,1 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)

Es un radical libre estable y se utiliza como indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto que posea actividad antioxidativa; el principio del método de DPPH consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (ejemplo compuesto fenólico) para generar el compuesto difenil picril hidrazina y una especie radical, en este

proceso la reacción desarrolla un cambio de color de violeta a amarillo o naranja pálido, a medida que disminuye la absorbancia detectable a 515 nm. (LEBEAU *et al.*, 2000).

- Radical 2,2-azobis 3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico (ABTS^{°+})

En el método ABTS (ácido 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazoline -6- acidosulfonico) el radical tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP, enzimática (peroxidasa, mioglobulina). Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical ABTS una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a λ (414, 645, 734, 815 nm), pero se mide a una longitud de onda λ 734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. El radical ABTS es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de antocianinas, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria (OVACO y PINEDA, 2011).

2.6. Evaluación sensorial

Es una técnica reproducible para identificar, cuantificar y describir las características de un producto y determinar su calidad sensorial, JIMENEZ (2006), indica que la evaluación sensorial es una disciplina de los panelistas para medir, analizar e interpretar las reacciones de las características de los alimentos, percibidos por los órganos de los sentidos, para determinar el sabor y aroma. SALVADOR y GUTIERREZ (2008), dicen que la evaluación sensorial del grano de cacao, es una herramienta metodológica que permite conocer las cualidades del producto y promover propuestas para la mejora del mismo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (CIPNA) y 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 de Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09°18'00" de Latitud Sur, a 75°53'00" de Latitud Oeste, con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84% y temperatura media anual de 24,5°C.

3.2. Materia prima

Cacao criollo: Las mazorcas de cacao criollo se obtuvieron del Fundo "Alborada" que se encuentra a la entrada al Caserío Papayal, Castillo Chico del Distrito de Rupa Rupa de la Provincia de Leoncio Prado, región de Huánuco, el cual fue brindado y certificado por el especialista el Ing. Mendis Paredes Arce.

Cacao CCN-51: La muestra fue tomada del fundo "San Francisco" del caserío Alto Pendencia del distrito de Daniel Alomía Robles, provincia de Leoncio Prado región de Huánuco que fue certificado por el especialista el Ing. Demetrio Lama Domínguez.

3.3. Equipos, materiales y reactivos

3.3.1. Equipos de laboratorio

Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation) SN 2M6G261002; balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión), capacidad 200g y modelo Adventurer Pro AV114 (OHAUS) capacidad 110 g; estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS HeatingDrying Oven); congelador FFV-2065FW -20°C (Frigidaire, USA); refrigerador Icebeam Door Cooling LG modelo GR-5392QLC (Corea); desionizador modelo D 7035 (Barnstead); agitador magnético modelo 625 standard (VWR™hotplate/stirrer); homogeneizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industrias. SI™); centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich); pH - metro (Mettler Toledo Seven Easy) pH 0-14, T° 0-100°C SN 8513902; selladora.

3.3.2. Materiales de laboratorio

- Materiales de vidrio

Matraces de Erlenmeyer de 50, 100 y 250 mL; pipetas graduadas de 10 mL; vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1000 mL; tubos de ensayo Gene Mate® de 10 mL; fioles de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000mL; probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 mL; frascos ámbar de 100mL.

- Otros materiales

Micropipetas 0-10 µL, 10-100µL, 20-200µL y 100-1000 µL; cubetas de poliestireno, Gene Mate® (1cmx 1cmx4.5cm); tips, FISHERBRAND® (1000 y

200 μ L); microtubos (1,5 - 2,00 mL); filtro de membrana de 0,2 μ m; pinzas; espátulas, gradillas.

3.3.3. Reactivos y solventes

Ácido gálico ($C_7H_6O_5$) al 98,1% Sigma Aldrich; folin-ciocalteu phenolre agent, 2N, Sigma Aldrich; carbonato de sodio al 20% (Na_2CO_3) p.a. ISO, Scharlau; metanol al 99% Merck CH_4O , CH_3OH ; cloroformo ($CHCl_3$) al 99% Merck; etanol al 99,99% Merck C_2H_6O , C_2H_5OH ; 1,1-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH; Sigma Aldrich, USA); 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline – 6 ácido sulfónico) diammoniumsalt (ABTS; Sigma Aldrich, USA); agua destilada desionizada (H_2O_{dd}); persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) p.a. Sigma Chemical.

3.4. Métodos de análisis

- Desgrasado: Se realizó el desgrasado por el método de Folch reportado por (AELSON *et al.*, 2009).
- Cuantificación de polifenoles totales: Se realizó por el método espectrofotométrico desarrollado por Follin Ciocalteu, *et al.* (1927), reportado por (SANDOVAL *et al.*, 2001).
- Cuantificación de antocianinas: Se realizó por el método del pH diferencial reportado por (POO, 2005).
- Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH): Se realizó por el método espectrofotométrico de luz visible a 517nm descrito por (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

- Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) del radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino -6- ácido sulfónico) (ABTS+): Se realizó por el método descrito por (FELLIGRINI *et al.*, 1999).
- Evaluación sensorial: Se realizó por el método descrito por la Asociación Peruana Productores de Cacao (APPCACAO), según (ZAMORA, 2007).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Obtención de la muestra

El procedimiento para la obtención de la muestra se presenta en la figura 5 y se describe a continuación.

Cosecha: Se cosecharon las mazorcas maduras de cacao criollo y CCN-51 con tijeras podadoras, acumulándolas en montones para después extraer los granos.

Quiebra: Las mazorcas fueron quebradas con un machete, para ello se hizo 2 líneas paralelas a lo largo de las mazorcas cuidando de no pasar hasta las almendras, evitando dañarlas para así facilitar su extracción.

Desgrane: Se extrajeron los granos de cacao de la placenta con los dedos, se tomó una muestra de 500g que se llevó a secar en estufa, denominándose grano fresco (**T1**), el resto se colocó en baldes con peso aproximado de 20kg de cacao en mucílago hasta llevarlas al cajón fermentador. Aparte se tomó 2kg de cacao que fue llevado a secar al sol por 2 días (**T2**) y 5 días (**T3**) denominándolas grano fresco secado.

Fermentación: Los granos se fermentaron en cajones de madera cedro con dimensiones de 1,5x0,4x0,7m con 2 divisiones a cada 0,5m que constan de

tableros removibles para facilitar la remoción del cacao con una capacidad de 160kg, se cubrieron los granos con costales de yute desde inicio hasta el término de la fermentación. Pasada las 48h que es el tiempo de fermentación anaerobia recomendada se hizo la primera remoción y después se continuó a cada 24 horas tomando muestras a los 2 días (T4) y 6 días de fermentación (T5), las muestras fueron llevadas a la estufa y se denominaron granos fermentados.

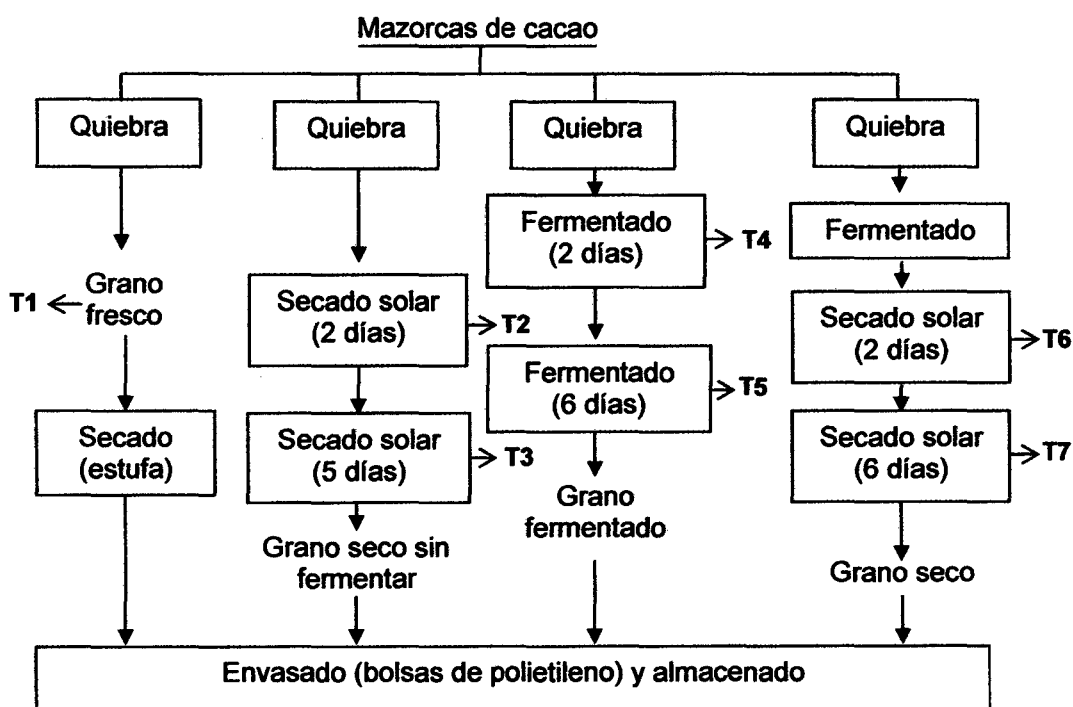


Figura 5. Flujograma de operaciones para la obtención de las muestras de cacao criollo y CCN-51.

Secado: Después de la fermentación los granos se sometieron a secado solar tomándose las muestras a los 2 días (T6) y 5 días (T7) las cuales se nombraron grano seco quedando un volumen total de 80kg de cacao seco.

Todas las muestras se estandarizaron a una humedad de 8%, por último las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se almacenaron hasta el día de su análisis.

3.5.2. Preparación de extractos

Las operaciones realizadas para la preparación del extracto para la cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante se muestran en la figura 6.

Descascarillado: Los granos de cacao fueron descascarillados de forma manual con una navaja.

Molido: Se redujo el tamaño de los granos con un molino para poder facilitar el proceso de desengrasado.

Desengrasado: Se realizó por solventes en frío (método de Folch), que consistió en pesar 20g de muestra de cacao molido el cual se maceró por 24 h en 50mL de solvente (1:2 v/v. metanol y cloroformo), luego se filtró para separar la torta de la grasa; la torta fue secada al ambiente durante 15 min para evaporar el solvente.

Envasado y almacenamiento: Las muestras secas fueron guardadas en bolsas de polietileno y rotuladas.

Extracto hidroalcohólico: Se prepararon los extractos hidroalcohólicos de cacao criollo y CCN-51 a una concentración de 100 mg/mL, para ello se pesó 2g de cada muestra desgrasada transfiriéndose a una probeta de 20mL donde se aforó con solución hidroalcohólica (50/50 v/v), luego trasladándose a un frasco

de vidrio de color ámbar, se tapó herméticamente macerándose por 24 h, pasado éste tiempo se filtró y se almacenó en congelación a -18°C .

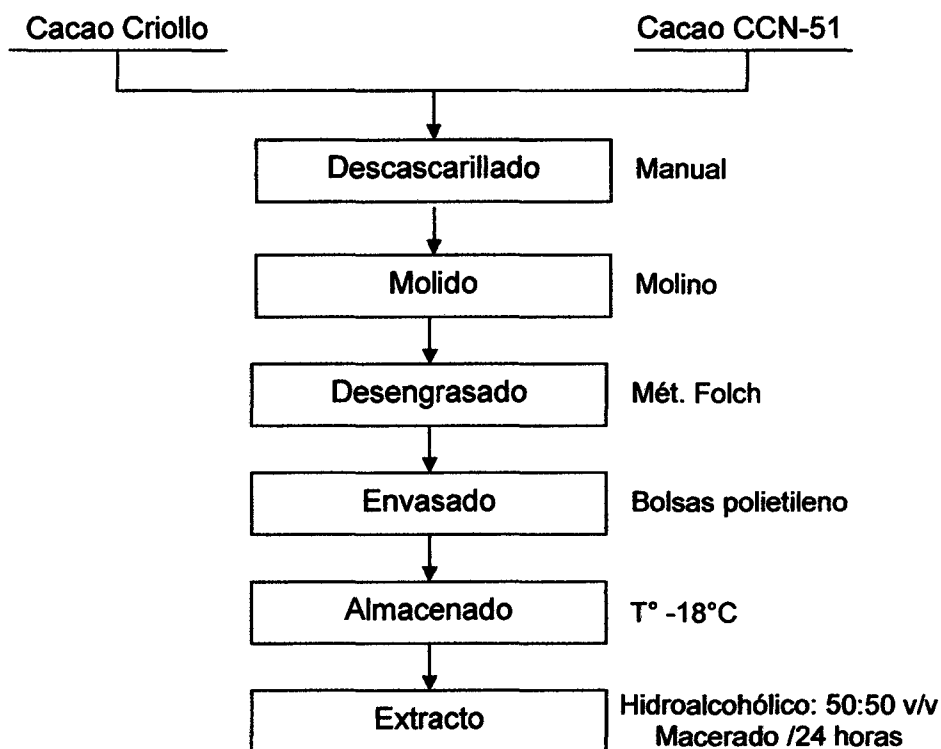


Figura 6. Flujograma de operaciones para la preparación del extracto hidroalcohólico de cacao.

3.5.3. Cuantificación de polifenoles totales en los granos cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

- Determinación de la curva estándar

La curva estándar se realizó preparando una solución stock de 10mL de ácido gálico a una concentración de 2mg/mL a partir de ello se hicieron las concentraciones siguientes: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50 y 1,00

mg/mL, cada dilución se preparó por triplicado. Se agregó a cada tubo 1580µL de agua desionizada y 20µL de muestra control y estándares, se homogenizó ligeramente, luego se agregó 100µL de solución de fenol Follin ciocalteu, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, luego se neutralizó la reacción agregando 300µL de Na₂CO₃ al 20% y finalmente se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, para una completa reacción, seguidamente se realizó la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm, con los resultados obtenidos se hizo la gráfica concentración vs absorbancia, se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

- Cuantificación de polifenoles totales

La cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100mg/mL (filtrado y centrifugado 10000 rpm/10min a 4°C), a partir de ello se realizó la dilución de trabajo 10 mg/mL, con 3 repeticiones por tratamiento; cabe destacar que se adicionó en los tubos por cada tratamiento 1580µL de agua destilada, 20µL de extracto diluido (10mg/mL), 100µL de fenol follin ciocalteu y finalmente 300µL Na₂CO₃ al 20% y se incubó por 2 h a temperatura ambiente, luego se hizo la lectura en espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700nm. Las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en equivalente de ácido gálico (g EAG/100g muestra). Todo el procedimiento se detalla en la figura 7.

Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial 2x7x3 en los tratamientos donde hubo

diferencia estadística se procedió a determinar la prueba de Tukey $p < 0,05$, para ello se utilizó el programa SAS.

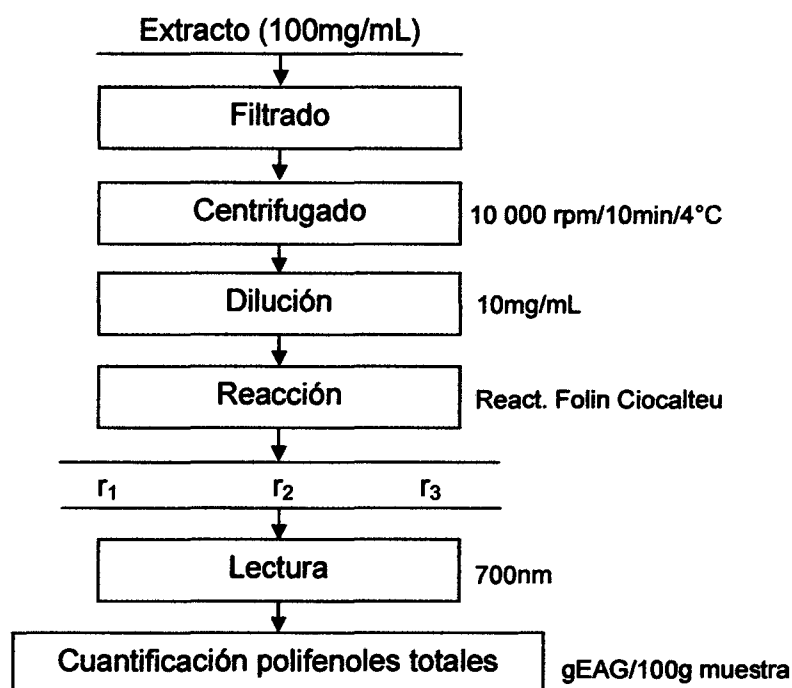


Figura 7. Diseño experimental para la cuantificación de polifenoles en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

3.5.4. Cuantificación de antocianinas en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

En la figura 8 se presenta el procedimiento del análisis de antocianina en las muestras de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio, la misma que se detalla a continuación.

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

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

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

$$C \text{ (mg/g)} = (A_{\text{pH}=1,0} - A_{\text{pH}=4,5}) \times 482,82 \left(\frac{1000}{24825} \right) \times DF$$

Dónde:

C: Es la concentración de la antocianina expresada en mg de cianidína-3-glucósido por g de muestra seca.

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

24825: Es la absortividad molar a 510 nm

pH = 1,0; pH = 4,5 es la corrección de la formación de productos de degradación.

DF: Es el factor de dilución.

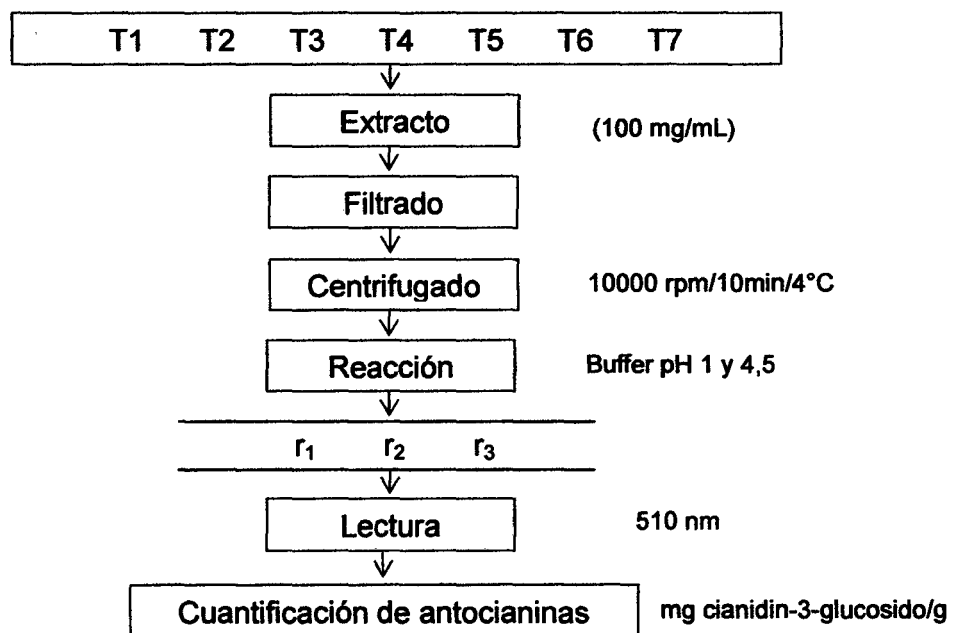


Figura 8. Esquema experimental para la cuantificación de antocianinas.

Procedimiento de análisis: Se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100mg/mL, filtrado y centrifugado 10000rpm/10min/4°C, se trabajó con 3 repeticiones por tratamiento, se hizo reaccionar con el buffer de pH 1 y pH 4,5 a 1mL para posterior realizar la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 510 nm y finalmente las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación y expresadas en mg cianidin-3-glucosido/g de muestra.

3.5.5. Determinación de la capacidad antioxidante en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

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

La determinación del coeficiente de inhibición del radical DPPH se presenta en la figura 9 el procedimiento se describe a continuación. Para ello se preparó 10 mL de solución stock de DPPH a 1mM en metanol al 99% de pureza, se agitó hasta la solubilización completa del compuesto y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de ésta solución stock se preparó 50 mL de DPPH a 20µM en metanol al 99% de pureza. Para la inhibición del radical DPPH se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100mg/mL (filtrado y centrifugado 10000 rpm/10min a 4°C), a partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 40, 100, 200 y 300µg/mL. En el cuadro 3 se describen los cálculos para las soluciones de trabajo.

Cuadro 3. Preparación de las diluciones de trabajo para el radical DPPH en muestras de cacao o criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

| Solución de trabajo (µg/mL) | Solución stock 100 mg/mL (µL) | Agua destilada (µL) | Volumen final (µL) |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 40 | 20 | 980 | 1000 |
| 100 | 50 | 950 | 1000 |
| 200 | 100 | 900 | 1000 |
| 300 | 150 | 850 | 1000 |

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

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

Dónde:

Abs Control: Absorbancia del control

Abs Muestra: Absorbancia de la muestra en 10 min.

Los resultados de la capacidad de inhibir (IC₅₀) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de 2x7x3 y en los tratamientos donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey p <0,05

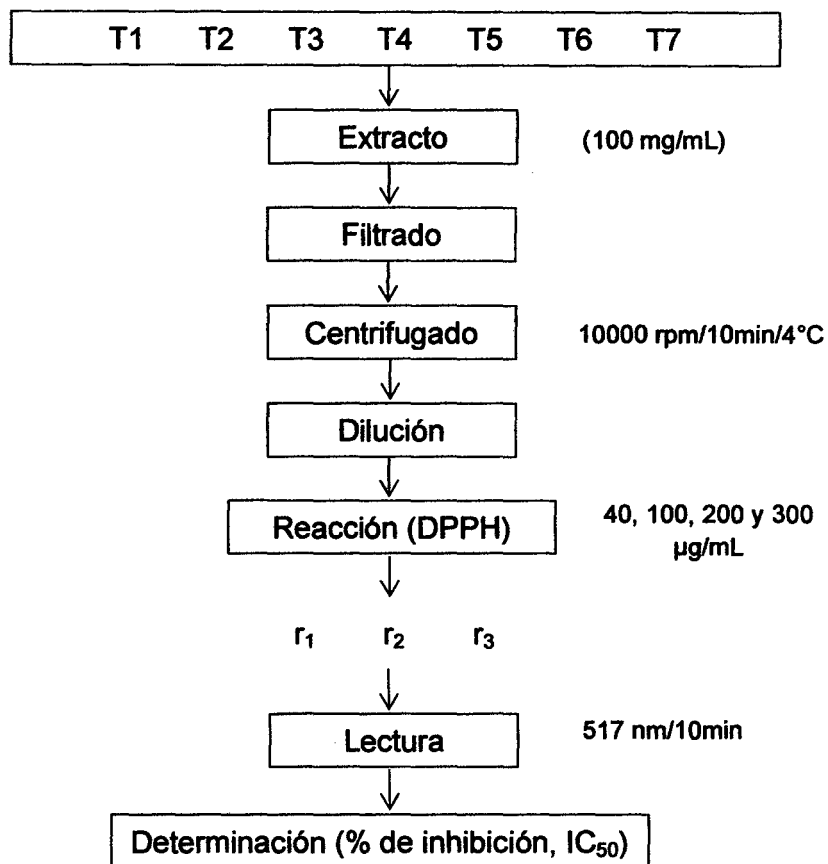


Figura 9. Diseño experimental para la evaluación de la actividad antioxidante en cacao criollo y CCN-51 con DPPH.

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

El radical ABTS^{o+} se forma tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (140mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16h. Una vez formado el radical ABTS^{o+}, se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia entre 0,7 a 1,2. Para la inhibición del radical ABTS^{o+} en los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL

(filtrado y centrifugado 10000 rpm/10min a 4°C), a partir de ello se prepararon soluciones de trabajo de: 26, 40, 50, 80 µg/mL tal como se presenta en la figura 10 y en el cuadro 4 se detalla las operaciones para la preparación de la solución de trabajo.

Cuadro 4. Preparación de las diluciones de trabajo para el radical ABTS^{o+} en muestras de cacao o criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

| Solución de trabajo (µg/mL) | Extracto 100 mg/mL (µL) | Solución hidroalcohólica (µL) | Volumen final (µL) |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------|
| 26 | 13 | 987 | 1000 |
| 40 | 20 | 980 | 1000 |
| 50 | 25 | 975 | 1000 |
| 80 | 40 | 960 | 1000 |

A una cubeta de poliestireno se adicionó 10 µL de la solución de trabajo y 990 µL de solución radical ABTS^{o+}, se realizó la lectura en un espectrofotómetro de UV/VIS a una longitud de onda de 734 nm cada 30 segundos por espacio de 5 minutos. El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente fórmula:

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

Dónde: Ac: Absorbancia de los controles

Am: Absorbancia de la muestra en función del tiempo (5 min).

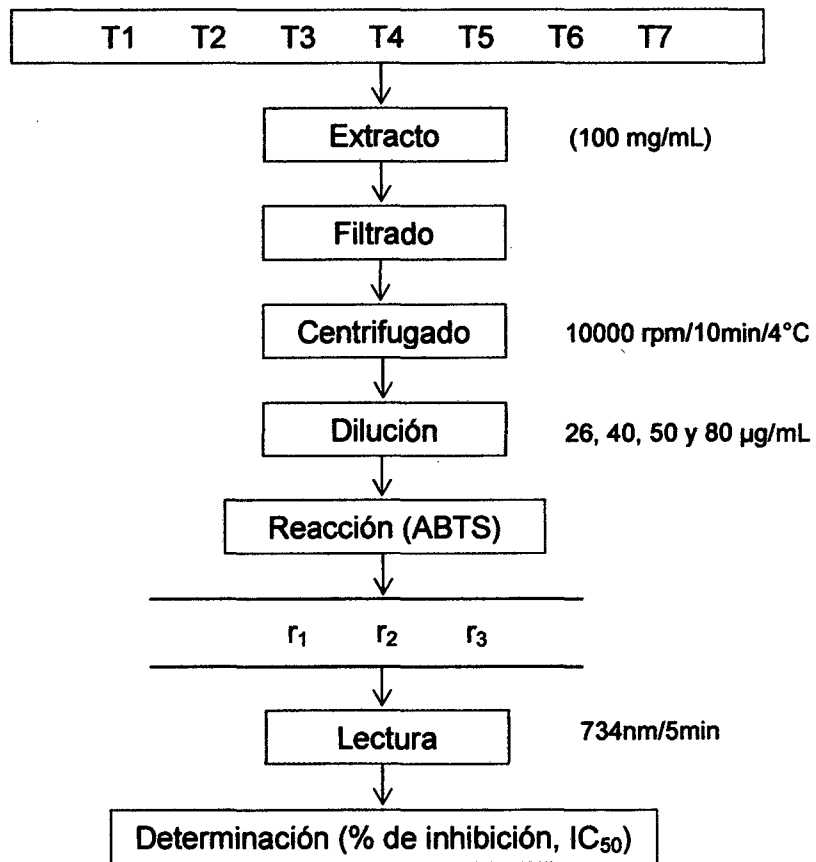


Figura 10. Esquema experimental para la determinación de la actividad antioxidante (radical $ABTS^{\circ+}$) de cacao criollo y CCN-51.

Los resultados de la capacidad de inhibición (IC_{50}) del radical $ABTS^{\circ+}$ se determinó en cada uno de los tratamientos, el cual nos indica la cantidad de extracto hidroalcohólico de cacao ($\mu\text{g/mL}$) necesarios para inhibir el 50% del radical $ABTS^{\circ+}$, la misma que se analizó mediante el diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de $2 \times 7 \times 3$. Para los niveles donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey $p < 0,05$

3.5.6. Evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

Preparación de la muestra: Se pesó 200 gramos de los granos de cacao y se llevaron a tostar por 15 minutos a 100°C después se dejaron enfriar para poder descascarillarlos manualmente obteniendo el grano limpio o nibs y luego se pasó al molinillo para granos eléctrico marca Bosch hasta obtener una pasta brillante la cual se puso en potes debidamente rotulados y se pusieron a 45°C en baño maría, tal como se presenta en la figura 11.

Desarrollo de la evaluación sensorial: La evaluación sensorial fue realizada por dos panelistas altamente entrenados y se evaluaron los atributos: sabor a cacao, acidez, astringencia, amargor, afrutado, floral, nuez, panela/malta, crudo/verde, otros. Cada catador tomó una cantidad pequeña de licor de cacao en el extremo de una paleta plástica pequeña y la colocó uniformemente sobre su lengua. El catador mantuvo la muestra en su boca por espacio de 15 a 20 segundos, determinando los atributos de cada una de ellas y registrando los resultados en un formato diseñado para el efecto con una escala hedónica del 0 al 10 (A-I), los catadores esperaron unos minutos para que se pierdan los sabores de la muestra anterior tomando agua o consumiendo galletas.

Se realizó un análisis multivariado, y el análisis de componentes principales (ACP) para graficar su respuesta en un Cluster (dendrograma) y conglomerados, el cálculo se realizó en el programa de INFOSTAT versión libre.

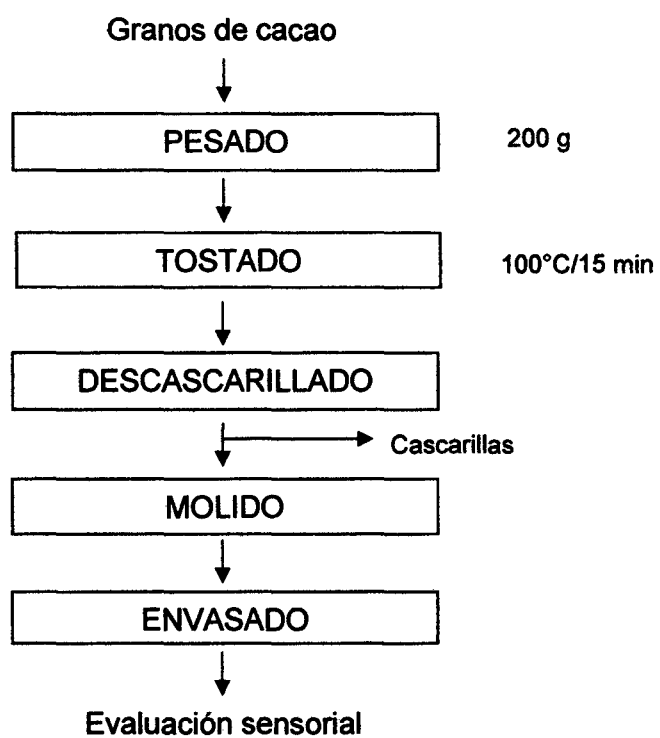


Figura 11. Esquema experimental para la evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

4.1.1. Determinación de la curva estándar

Para la cuantificación de polifenoles totales en los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio fue necesario establecer una curva patrón y se elaboró en base al ácido gálico. Las diluciones estuvieron comprendidas entre 1 a 0,0625 mg/mL, los resultados se presentan en el cuadro 5, con los valores encontrados se procedió a realizar la curva estándar la cual se presenta en la figura 12.

Cuadro 5. Resultados de las absorbancias para la curva estándar de polifenoles (mg EAG/100g).

| Concentraciones (mg EAG/mL) | Absorbancias (700nm) | | | Promedio |
|--------------------------------|----------------------|-------|-------|----------|
| | R1 | R2 | R3 | |
| 1 | 0,818 | 0,880 | 0,936 | 0,878 |
| 0,5 | 0,515 | 0,456 | 0,353 | 0,441 |
| 0,25 | 0,198 | 0,124 | 0,301 | 0,208 |
| 0,125 | 0,129 | 0,145 | 0,110 | 0,128 |
| 0,0625 | 0,042 | 0,071 | 0,076 | 0,063 |

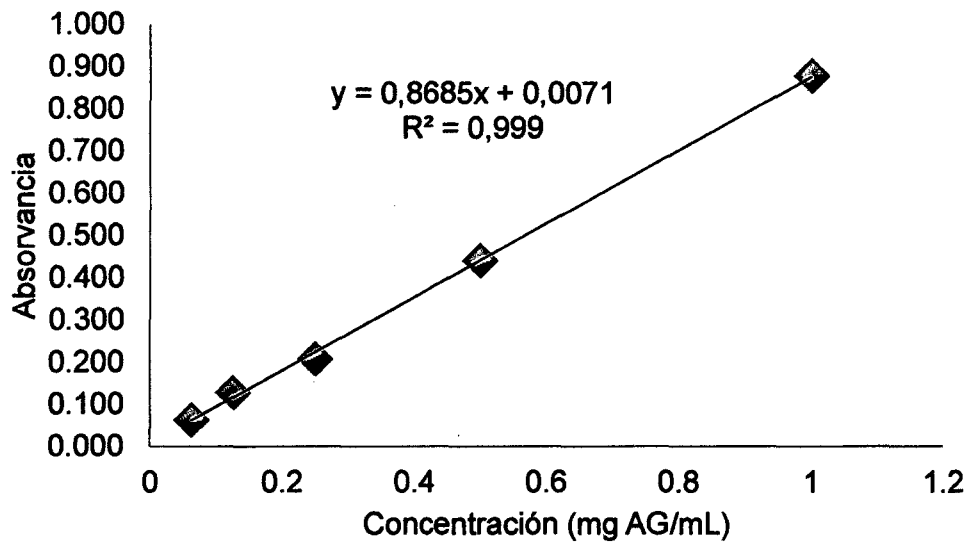


Figura 12. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles.

ANDREW *et al.* (1989) indica que el método de Follin-Ciocalteu permite medir fenoles totales y para la cuantificación debe crearse la curva de calibración y puede realizarse con ácido gálico (GAE), porque este es un compuesto estable y pierde solo 5% de su valor real después de dos semanas de refrigerado y tapado.

4.1.2. Cuantificación de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51

Los polifenoles han ganado mucho interés recientemente debido a su capacidad antioxidante y posibles beneficios para la salud humana, el cacao (*Theobroma cacao* L.) es una fuente rica en polifenoles y actividad antioxidante, analizando los resultados de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio mediante el diseño completamente al azar (DCA) con

arreglo factorial de 2x7x3 podemos indicar que se encontró diferencia estadística significativa y se presentan en (A-II).

En el cuadro 6 y figura 13 se presenta los resultados del contenido de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio, analizando los resultados mediante la prueba estadística se encontró que existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) (A-IIa y A-IIb) entre los tratamientos, realizando la comparación de medias mediante tukey podemos apreciar el mayor contenido de polifenoles totales lo presentó el grano sin fermentar tanto para el cacao criollo ($8,012 \pm 0,004$ g EAG/100g) y CCN-51 ($9,196 \pm 0,015$ g EAG/100g), el valor encontrado es bastante alto, al respecto OTHMAN *et al.* (2005) indica que en granos de cacao no fermentado el contenido de polifenoles es alto alrededor del 12 a 18% (peso seco). Esto se debe a que el 60% del total de los polifenoles en granos frescos de cacao son isómeros de flavonoles (epicatequina y catequina) y oligómeros de procyanidinas y estos compuestos son potenciales candidatos para combatir radicales libres.

Así mismo, comparando entre el cacao criollo y el CCN-51 encontramos que ambas tienen diferente contenido de polifenoles totales, esto puede ser explicado por ZHAO *et al.* (1999) que indican que los compuestos polifenólicos, constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados como metabolitos secundarios, se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol por molécula y estas son importantes para la fisiología de las plantas porque contribuyen a la resistencia del ataque de microorganismos, insectos y ayudan a preservar su integridad debido a su exposición a ambientes estresantes incluyendo radiaciones ultravioleta y

temperaturas relativamente altas.

Los valores encontrados en los granos sin fermentar concuerdan con lo reportado por HUANCA (2010) para cacao criollo $7,911 \pm 0,037$ y CCN-51, $9,209 \pm 0,034$ g EAG/100g respectivamente. TOMAS-BARBERAN *et al.* (2007) reporta en granos de cacao no fermentados y secados de diferentes países es variable, Costa de Marfil variedad forastero $8,15 \pm 1,82$ g EAG/100g, Colombia variedad amazon $8,14 \pm 0,37$ g EAG/100g, Ecuador variedad amazon, trinitario, canelo y amazon híbrido $8,42 \pm 0,87$ g EAG/100g, Venezuela variedad trinitario $6,43 \pm 0,56$ g EAG/100g, y Perú variedad criollo 5 g EAG/100g.

Los tratamiento T2 y T3 que corresponden a los granos de cacao sin fermentar pero secado a 2 y 5 días, el contenido de polifenoles disminuye para el cacao criollo en el secado 2 días degradó 1,2% y a 5 días de secado degradó 5%; para el caso del CCN-51 a los 2 días degradó 4,4% y a los 5 días 7,3%, comparando estos resultados podemos indicar que el secado provoca la pérdida de polifenoles siendo mayor en el CCN-51, esto puede ser debido a lo indicado por EFRAIM *et al.* (2009) quien durante la etapa de secado se reduce el contenido de polifenoles, esto se atribuye al pardeamiento enzimático causada por la enzima polifenol oxidasa; así mismo, cuanto mayor sea la temperatura y la humedad, aumenta la oxidación de los polifenoles presentes en el cacao; CROS (2000) indica que en el secado suceden muchas reacciones tales como la reducción del contenido de ácido acético por evaporación, oxidación de los polifenoles y la síntesis de aldehídos; FENGLIN *et al.* (2013) dice que el contenido de polifenoles de los granos cacao disminuyeron aún más después del secado, los granos de cacao tienen que secarse sean fermentados o no

con la finalidad de poder comercializar y evitar el daño microbiano tal como indica ORTIZ *et al.* (2009) que en la etapa de secado el contenido de humedad se reduce hasta 8% evitando el desarrollo de mohos que deterioran la calidad del grano y el color varia a marrón por las reacciones de condensación de la proteína a quinona que ocurre después de la oxidación enzimática de polifenoles tales como las leucocianidinas y las epicatequinas.

Durante el proceso de fermentación de los granos de cacao a los 2 y 6 días encontramos que en el contenido de polifenoles totales existe diferencia estadística solo en el cacao criollo $6,961 \pm 0,020$ g EAG/100g (2 días de fermentación) y $6,729 \pm 0,004$ g EAG/100g (6 días de fermentación), por el contrario en el grano de cacao CCN-51 a los 2 y 6 días de fermentación no presentaron diferencia estadística $7,690 \pm 0,048$ g EAG/100g y $7,644 \pm 0,050$ g EAG/100g, como podemos apreciar cada variedad tiene un diferente comportamiento en el contenido de polifenoles esto puede ser explicado por ZAPATA *et al.* (2013) que cita que el efecto de la fermentación sobre los clones de cacao no fue uniforme, observándose cambios positivos y negativos en los contenidos de los diversos metabolitos secundarios dependiendo de la variedad. En los clones ICS 1 e ICS 95, los fenoles totales aumentaron después del procesamiento en 42 y 54%, respectivamente y en ICS 60 y TSH 565, hubo una disminución de 20 y 35%; así mismos, HII *et al.* (2009) indican que los tres principales grupos de polifenoles de cacao se pueden distinguir, las catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%); la principal catequina es epicatequina con hasta 35% de contenido de polifenoles y pueden ser influidos por el proceso de transformación.

Cuadro 6. Cuantificación de polifenoles totales de granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

| Muestras | Tra. | Criollo g EAG/100g | % Deg. | CCN-51 g EAG/100g | % Deg. |
|---------------------------|------|---------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| Fresco no fermentado | T1 | 8,012±0,004 ^a | 0 | 9,196±0,015 ^a | 0 |
| Fresco, secado 2 días. | T2 | 7,918±0,008 ^b | 1,2 | 8,784±0,036 ^b | 4,4 |
| Fresco, secado 5 días | T3 | 7,615±0,020 ^c | 5 | 8,513±0,094 ^b | 7,3 |
| Fermentado 2 días | T4 | 6,961±0,020 ^d | 13 | 7,690±0,048 ^c | 16,3 |
| Fermentado 6 días | T5 | 6,729±0,004 ^e | 16 | 7,644±0,050 ^c | 16,8 |
| Fermentado, secado 2 días | T6 | 6,259±0,023 ^f | 21,9 | 7,431±0,018 ^c | 19,2 |
| Fermentado, secado 5 días | T7 | 6,011 ±0,007 ^g | 24,9 | 6,561±0,164 ^d | 28,6 |

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

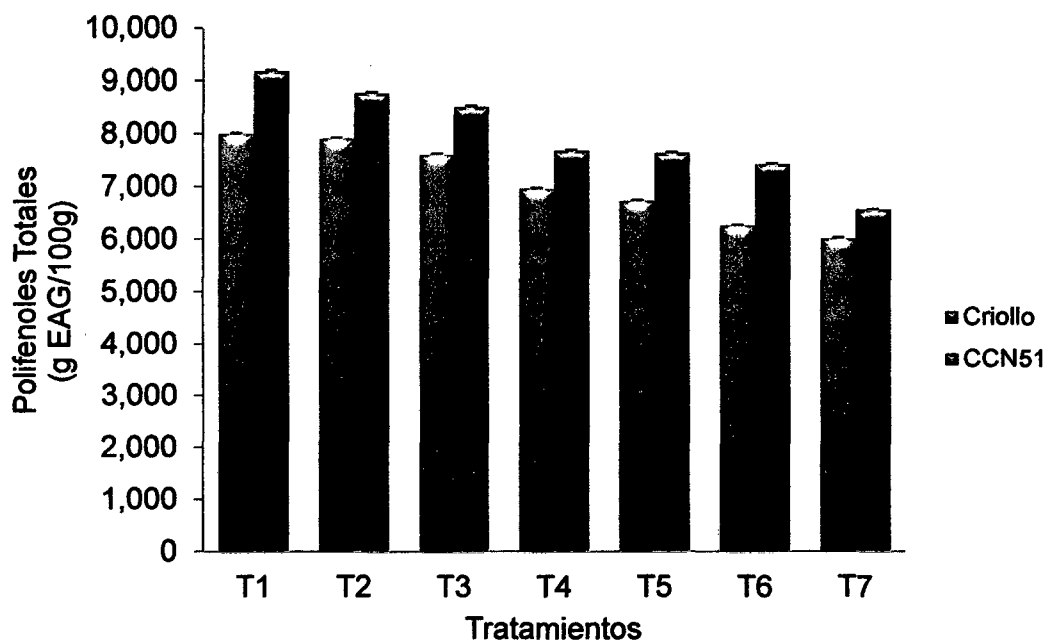


Figura 13. Representación del contenido de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

Durante el proceso de fermentación a los 2 y 6 días existió pérdida en el contenido de polifenoles totales en el caso del criollo a los 2 días se degradó 13% y a los 6 días 16%; para el caso del cacao CCN-51 a los 2 días degradó 16,3% y a los 6 días 16,8%, comparando estos resultados podemos indicar que se encuentran dentro de los rangos reportados por otros autores, NIEMENAK *et al.* (2005) cita que los fenoles totales en algunos clones aumentaron aproximadamente un 25% después de 2 días (SNK10, T79/467, UPA143), disminuyó en otros, entre un 14% y 25% (ICS84, ICS1), mientras que se mantiene constante en clones SNK413, IMC60, ICS95 y UPA134; FORSYTH (1952) indica que las pérdidas de fenoles totales se deben a la difusión fuera de los cotiledones y se puede calcular como 24% después de 60h de fermentación, llegando a 58% después de 8 días. HANSEN *et al.* (1998) menciona que la pérdida de polifenoles en granos de cacao puede deberse a la reacción de oxidación que es a la vez no enzimática y enzimática mediante la acción de la enzima polifenol oxidasa que es fuertemente inactivado durante el primer día de la fermentación, permaneciendo sólo 5 y 6% de enzima actividad después de 1 y 2 días, respectivamente.

El contenido de polifenoles totales en los granos fermentados 6 días para el criollo fue $6,729 \pm 0,004$ g EAG/100g y CCN-51 fue $7,644 \pm 0,050$ g EAG/100g, esos valores se encuentran muy cercanos a los reportados por HUANCA (2010) en los granos fermentados de cacao criollo $7,742 \pm 0,012$ y CCN-51 $7,799 \pm 0,015$ g EAG/100g respectivamente; disminuyendo en un 2,13% en los granos criollos y un 15,31% después de la fermentación. Así mismo, JONFIA-ESSIEN *et al.* (2007) en un estudio referido al contenido de polifenoles

totales en 4 híbridos (amazon/trinitario, inter amazon híbrido, amazon/amelonado y cacao tradicional) de cacao reportaron 7 a 8 g EAG/100g.

Podemos apreciar en los granos de cacao fermentado y secado 2 y 5 días, que entre las dos variedades existe diferencia estadística, para el caso del cacao criollo a los 2 días el contenido de polifenoles totales fue $6,259 \pm 0,023$ g EAG/100g y a los 5 días $6,011 \pm 0,007$ g EAG/100g y para el CCN-51 a los 2 días fue $7,431 \pm 0,018$ g EAG/100g y a los 5 días $6,561 \pm 0,164$ g EAG/100g, como podemos apreciar que ambos cacaos tienen comportamientos diferentes esto puede deberse a lo indicado por Hill *et al.* (2009) que cita que la fermentación y el secado pueden afectar a la concentración de los polifenoles debido principalmente a las reacciones de pardeamiento enzimático. PEREA-VILLAMIL *et al.* (2009) indica que la concentración de polifenoles en las semillas de cacao secas y libres de grasa oscila entre el 15-20% (p/p) y están constituidos por un 37% de catequinas, un 4% de antocianinas y un 58% de proantocianidinas y ZAPATA *et al.* (2013) en la fermentación aerobia se forman en los granos pigmentos marrones constituidos por polifenoles; la epicatequina y catequina se oxidan a quinonas, y la condensación de las proteínas y polifenoles causan una reducción de la astringencia y sabor amargo, las quinonas también pueden acomplejarse con aminoácidos, péptidos, proteínas o polimerizar con otros flavonoides.

Analizando todo el proceso de beneficio del grano del cacao podemos apreciar que el criollo degradó 24,9% y el cacao CCN-51 degradó 28,6% del contenido de polifenoles con respecto al grano sin fermentar, estos resultados concuerdan con lo reportado por MOREAU *et al.* (2013) los fenoles

totales presentes en el cacao consiguieron reducirse durante la fermentación a 30% del valor inicial; HUANCA (2010) cacao criollo disminuyó 3,9% y CCN-51 18%, esto se debe a que durante la fermentación los polifenoles están sujetos a modificaciones bioquímicas por polimerización y forman un complejo con proteínas lo que genera un decrecimiento de la solubilidad y la astringencia. CIENFUEGOS-JOVELLANOS *et al.* (2009) cita que en un 90% decae la concentración de epicatequina después de la fermentación y secado; EFRAIM *et al.* (2009) durante la etapa de fermentación, el contenido total de polifenoles disminuye alrededor del 70% y el contenido de epicatequina, que comprende el grupo fenólico de flavanoles redujo en un 90%. FORSYTH y QUESNEL (1957) exponen que los polifenoles epicatequina y catequina son oxidados a quinonas.

Comparando la cantidad de polifenoles encontrados al final del proceso de beneficio para el criollo fue $6,011 \pm 0,007$ y para el CCN-51 $6,561 \pm 0,164$ g EAG/100g, estos resultados concuerdan con los reportes de HUANCA (2010) en granos de cacao fermentado y secado criollo $7,597 \pm 0,011$ y en CCN-51, $7,547 \pm 0,038$ g EAG/100g. CHAVEZ (2012) en granos comerciales fermentados y secados en tres lotes distintos varió de $5,675 \pm 0,145$ a $4,871 \pm 0,135$ g EAG/100g. HILL *et al.* (2009) en granos de cacao de 4,00 a 8,42 g EAG/100g según su origen geográfico y también las variedades plantadas. CONDEZO (2011) en calidad primera de granos comerciales fue $6,356 \pm 0,05$ g EAG/100 g y en granos comerciales defectuosos fue $5,489 \pm 0,01$ g EAG/100g.

En general el contenido de polifenoles totales en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio presentaron variabilidad en cada una de

las operaciones de beneficio, siendo mayor en los granos frescos y en todas las etapas de beneficio el contenido de polifenoles disminuyó, este comportamiento puede ser explicado por OTHMAN *et al.* (2005) quien indica que el contenido de polifenoles puede variar por la variedad, el grado de fermentación y los parámetros de proceso y NIEMENAK *et al.* (2005) indica que existen varios factores internos y externos que afectan a la calidad y/o cantidad de compuestos polifenólicos en las plantas, estos incluyen la genética (variedad), la diversidad regional, factores como el medio ambiente, la intensidad de la luz, humedad, temperatura, el uso de fertilizantes, heridas, infecciones u otros factores de estrés. PÉREZ-JIMÉNEZ y SAURA-CALIXTO (2006), ZAPATA *et al.* (2013), MOREAU *et al.* (2013) y FENGLIN *et al.* (2013) indican que la calidad está relacionada con el origen de las almendras, su fermentación, secado y tostado, así mismo influye el genotipo y la postcosecha. GONZÁLEZ *et al.* (2012) refiere que el cacao criollo tiene cotiledones blancos y un sabor suave de nuez, estos granos son susceptibles a las enfermedades y producen bajos rendimientos.

4.2. Cuantificación de antocianinas en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

Las antocianinas son compuestos del grupo de los flavonoides que se caracteriza por su alto poder reductor, analizando los resultados de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio mediante el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 2x7x3 podemos indicar que se encontró diferencia estadística significativa y se presentan en (A-III).

Los resultados del contenido de antocianinas en los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio se presentan en el cuadro 7 y figura 14, analizando los resultados mediante la prueba estadística se encontró que existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) (A-IIIa y A-IIIb) entre los tratamientos, realizando la comparación de medias mediante tukey podemos apreciar que el mayor contenido de antocianinas lo presentó el grano sin fermentar tanto para el cacao criollo ($3,352 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g) y CCN-51 ($5,639 \pm 0,016$ mg cianidina-3-glucósido/g), este contenido posiblemente se debe a lo reportado por GARZÓN (2008) que indica que las antocianinas se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula y poseen diferentes funciones en la planta del cacao, como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas, la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana. Los cotiledones de las semillas frescas de cacao la fracción de antocianina está dominada por cianidina-3- α -L-arabinósido y cianidina-3- β -D-galactósido (MORALES *et al.*, 2012).

Según los resultados encontrados podemos apreciar que el mayor contenido de antocianinas se encuentran en los granos sin fermentar, esto puede deberse a lo reportado por FORSYTH (1952) que cita que los principales compuestos de antocianina en granos recién cosechados van de 0,466 a 4,552 mg cianidina-3-arabinósido/g, el contenido del cyanindin-3-arabinósido se encuentra más alto en granos no fermentados que en granos fermentados. CUBERO (1992), reportó en los granos de cacao sin fermentar 12 mg cianidina-3-glucósido/g.

Comparando el contenido de antocianinas entre el criollo ($3,352 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g) y el CCN-51 ($5,639 \pm 0,016$ mg cianidina-3-glucósido/g) se puede apreciar que este último tuvo el mayor valor, cabe resaltar que el CCN-51 pertenece a los forasteros y MARQUEZ (2009) determinó en granos de cacao maduros sin fermentar, que los forasteros poseen más de 4 mg de antocianinas por grano de tejidos, mientras que los cacaos criollos e híbridos (trinitario), la concentración de antocianinas esta entre 0,1 y 2,3 mg/g.

Del mismo cuadro y figura se puede apreciar que el segundo lugar para ambas muestras de cacao fue ocupado por los granos frescos y secado 2 días, para el criollo fue $3,059 \pm 0,024$ y para CCN-51 fue $4,149 \pm 0,016$ mg cianidina-3-glucósido/g, como podemos apreciar en ambos casos existió una degradación del contenido de antocianinas con respecto al grano fresco, el criollo degradó 8,7% y el CCN-51 degradó 26,4%, este comportamiento puede ser aclarado por ZAPATA *et al.* (2013) quien indica que el secado causa descomposición de las paredes de las células pigmentarias y los contenidos quedan expuestos a otros componentes dentro del grano.

Los granos frescos secados por 5 días también tuvieron un comportamiento similar en el contenido de antocianinas que en el secado a 2 días, para ambas muestras este contenido disminuyó con respecto al valor inicial del cacao criollo $2,285 \pm 0,005$ mg cianidina-3-glucósido/g (degradó 31,8%) y el CCN-51 $3,138 \pm 0,011$ mg cianidina-3-glucósido/g (degradó 44,3%), este comportamiento puede ser explicado por BADUI (2006) que a medida que aumenta la temperatura se acelera la decoloración de los cotiledones, ya que

se favorece la extracción dada su alta hidrosolubilidad, las antocianinas se pueden perder fácilmente por lixiviación.

En ambas muestra el contenido de antocianinas fluctuó entre 2,285 y 3,138 mg cianidina-3-glucósido/g, como podemos apreciar los valores reportados son superiores a los indicados por ZAPATA *et al.* (2013) reporta en el clon TSH565 sin fermentar y secado a 5 días 1,60 mg cianidina-3-glucósido/g y el ICS-95 tuvo 0,59 mg cianidina-3-glucósido/g presentan mayor contenido de antocianinas en comparación con otros clones en granos sin fermentar pero secados por 5 días.

Con respecto al comportamiento de los granos de cacao criollo y CCN-51 con 2 días de fermentación podemos indicar que el contenido de antocianinas también disminuyó con respecto al grano inicial para el criollo $2,017 \pm 0,005$ mg cianidina-3-glucósido/g (degradó 40%) y el CCN-51 tuvo $3,056 \pm 0,012$ mg cianidina-3-glucósido/g (degradó 45,8%); cómo podemos apreciar el contenido de antocianinas siguió disminuyendo y este comportamiento puede ser aclarado por NIEMENAK *et al.* (2005) que cita que los granos frescos de cacao contienen pigmentos de antocianinas de color púrpura, cianidina-3- β -galactósido y cianidina 3- α -L-arabinósido que durante la fermentación estos pigmentos son hidrolizados a glucósidos resultando un cambio del cotiledón de violeta a marrón. Según ORTIZ *et al.* (2009) las principales modificaciones del color, se presentan en el día 2 del proceso de fermentación, son debidas a la relación antocianinas monómeros/polímeros amarillos y pardos, ocurriendo poca evolución del color a partir del día 4.

Cuadro 7. Cuantificación de antocianinas de granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

| Muestras | Tra. | Criollo mg cianidina-3- glucósido/g | % Deg. | CCN-51 mg cianidina-3- glucósido/g | % Deg. |
|--------------------------|------|---|--------|--|--------|
| Fresco no fermentado | T1 | 3,352±0,003 ^a | 0 | 5,639±0,016 ^a | 0 |
| Fresco, secado 2 días | T2 | 3,059±0,024 ^b | 8,7 | 4,149±0,016 ^b | 26,4 |
| Fresco, secado 5 días | T3 | 2,285±0,005 ^c | 31,8 | 3,138±0,011 ^c | 44,3 |
| Fermentado 2 días | T4 | 2,017±0,005 ^d | 40 | 3,056±0,012 ^d | 45,8 |
| Fermentado 6 días | T5 | 1,342±0,002 ^e | 60 | 2,642±0,004 ^e | 53,1 |
| Fermentado-secado 2 días | T6 | 1,046±0,017 ^f | 68,9 | 1,590±0,003 ^f | 71,7 |
| Fermentado-secado 5 días | T7 | 0,946±0,008 ^g | 71,9 | 1,181±0,007 ^g | 79 |

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

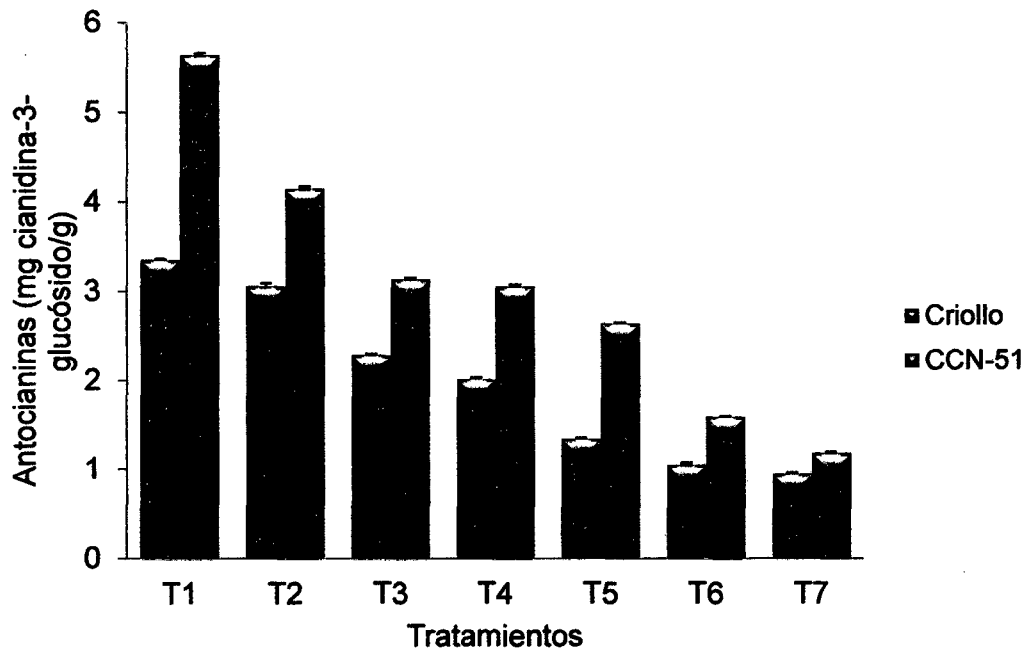


Figura 14. Representación del contenido de antocianinas en cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

Comparando entre ambas muestras de cacao podemos indicar que a los 2 días de fermentación el CCN-51 tiene una mayor cantidad de antocianinas comparado al criollo esto puede deberse según VERDESOTO (2009) cacaos tipo criollo y forastero cambian en sus componentes químicos durante la etapa del fermentado. Según los resultados el contenido de antocianinas disminuyó a medida que pasa el tiempo y NIEMENAK *et al.* (2005) en el clon ICS-95 en el primer día de fermentación tuvo 3,5 mg cianidina-3-arabinosido/g y en el segundo día 3,1 mg cianidina-3-arabinosido/g y el clon ICS-1 en el primer día 2,4 y en el segundo día 1,6 mg cianidina-3-arabinosido/g.

Analizando los resultados a los 6 días de fermentación el contenido de antocianinas siguió disminuyendo comparado a la muestra fresca inicial, el cacao criollo se degradó 60% y el CCN-51 53,1%, como se puede apreciar a medida que pasa el tiempo de fermentación el contenido de antocianinas disminuye. Durante la fermentación de los granos de cacao, las antocianinas son hidrolizadas por acción de las glicosidasas, que causan el blanqueamiento de los cotiledones, estas enzimas hidrolizan el enlace glicosídico de las antocianinas, producen azúcar y aglicona que reduce así el contenido de antocianinas (ZAPATA *et al.*, 2013). LOPEZ *et al.* (2003) reporta que durante la fermentación sucede la oxidación de las antocianinas y complejos de aminoácidos con compuestos fenólicos formando quinonas, estas contribuyen disminuyendo el amargor y astringencia de las almendras. Así mismo, ENRÍQUEZ (1985) indica que los granos de cacao son transformados a través de procesos enzimáticos, en sustancias incoloras que más tarde por

medio de la actividad de las oxidasas toman la coloración café bajo condiciones aeróbicas.

En el cacao criollo el contenido de antocianinas fue $1,342 \pm 0,002$ mg cianidina-3-glucósido/g y en el CCN-51 $2,642 \pm 0,004$ mg cianidina-3-glucósido/g, como podemos apreciar el CCN-51 siempre tuvo mayor contenido de antocianinas que el criollo, este comportamiento se puede aducir que se debe a lo reportado por ORTIZ *et al.* (2009) quien indica que el tiempo de fermentación está relacionado con el tipo de cacao, el criollo fermenta más rápidamente que el forastero, tardando de 2 a 3 días y el forastero de 5 a 7 días.

Del mismo cuadro y figura los granos de cacao fermentados 6 días y secados por 2 días se puede apreciar que tuvieron un comportamiento similar las dos muestras, para el caso del criollo degradó 68,9 % y el CCN-51 degradó 71,7%, como podemos apreciar en el proceso de secado a nivel del grano de cacao sigue generándose muchos cambios que básicamente conllevan al color marrón del cotiledón, esto puede ser explicado por ORTIZ *et al.* (2009) quienes citan que en el secado del grano fermentado se disminuye la humedad, los taninos y proteínas, este afecta las características químicas del grano porque continúan las reacciones térmicas iniciadas en la fermentación originándose fracciones volátiles mediante reacciones de oscurecimiento no enzimático vía Maillard y formación de pigmentos marrones y CHAVEZ (2012) indica que la pérdida de antocianina puede deberse a que son muy inestables y se degradan ante algunos factores como la temperatura ya que no deben exceder los 40°C.

En el cacao criollo y CCN-51 se tuvo $1,046 \pm 0,017$ y $1,590 \pm 0,003$ mg cianidina-3-glucósido/g respectivamente, como podemos apreciar para ambas muestras existe diferencia entre el contenido de antocianinas, esto es aclarado por CUBERO (1992) quien indica que el grupo criollo presentó más antocianinas que el grupo forastero, luego el grupo trinitario y finalmente el catongo sin fermentar, después de que se fermentan fue el grupo forastero el que más antocianinas retuvo.

Finalmente el menor contenido de antocianinas lo presentó las muestras de cacao fermentadas 6 días y secados por 5 días, analizando los resultados podemos indicar que el contenido de antocianinas disminuyó comparado a la muestra inicial, en el criollo la antocianina se degradó 71,9% y el CCN-51 79%, esta disminución puede deberse a los indicado por NOGALES *et al.* (2006) el desarrollo del color marrón en los granos de cacao está relacionado con la reacción de oxidación, debida a la penetración por difusión del oxígeno en los cotiledones durante la desecación, es favorecida cuando el secado se realiza lentamente y AFOAKWA *et al.* (2012) dice que en el secado se presentan reacciones debidas al tratamiento térmico como la degradación de antocianinas vía la reacción de Maillard.

En el cacao criollo y CCN-51 el contenido de antocianinas fue $0,946 \pm 0,008$ y $1,181 \pm 0,007$ mg cianidina-3-glucósido/g respectivamente, los resultados reportados comparados con otros autores se encuentran dentro del rango, según CHAVEZ (2012) en grano comercial $1,49 \pm 0,043$ mg cianidina-3-glucósido/g de muestra; ZAPATA *et al.* (2013) dice que para granos fermentados por 6 días y secados por 5 días en CCN-51 $0,27$ mg cianidina-3-

glucósido/g y en ICS1 1,05 mg cianidina-3-glucósido/g y CONDEZO (2011) en granos comerciales buenos $12,209 \pm 0,20$ a $2,132 \pm 0,02$ y en granos defectuosos $11,410 \pm 0,18$ a $1,728 \pm 0,10$ mg cianidina-3-glucósido/g esta variación puede deberse a la calidad de fermentación que ha sufrido el grano. Así mismo, CUBERO (1992) en almendras fermentadas 1,72 mg cianidina-3-glucósido/g, el contenido de antocianinas permite separar mejor aquel cacao bien fermentado de aquel sin fermentar.

4.3. Determinación de la actividad antioxidante en granos de cacao criollo y CCN-51

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

La actividad antioxidante en granos de cacao y productos de chocolatería está determinada por el contenido de polifenoles, flavonoles como (-) epicatequina y (+) catequina, y otros oligómeros conocidos como proantocianidinas, los mismos que son evaluados mediante la prueba de DPPH, analizando los resultados de los cacaos criollo y CCN-51 con y sin beneficio mediante el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de $2 \times 7 \times 3$ podemos indicar que se encontró diferencia estadística significativa y se presentan en (A-IV).

Los resultados del IC_{50} en los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio se presenta en el cuadro 8 y figura 15, podemos apreciar que entre los tratamientos existe diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) (A-IVa) y (A-IVb), realizando la comparación de medias la mayor eficiencia frente a

este radical se encontró en el grano sin fermentar criollo IC_{50} $36,410 \pm 0,152$ $\mu\text{g/mL}$ y CCN-51 IC_{50} $35,557 \pm 0,086$ $\mu\text{g/mL}$, al respecto EFRAIM *et al.* (2009) indica que las semillas de cacao sin fermentar tienen 6-8% de compuestos fenólicos en peso seco; así mismo, GUTIÉRREZ (2002) indica que el cacao tiene catequina y proantocianidinas las cuales tienen fuerte actividad antioxidante *in vitro*. Entre las dos variedades existe diferencia esto puede ser explicado por FENGLIN *et al.* (2013) quien indica que las condiciones meteorológicas (microclima y la luz del sol) y la intensidad de la luz (posición de las vainas en el árbol, la luz solar directa) influyen en el contenido de antioxidantes de los granos de cacao recién cosechados.

Los resultados de los granos sin fermentar sobre la actividad antioxidante presentan variabilidad sin embargo nuestro reporte no está fuera del rango, según HUANCA (2010) en granos frescos de cacao criollo obtuvo IC_{50} $52,846 \pm 0,38$ $\mu\text{g/mL}$ y en CCN-51 IC_{50} $38,754 \pm 0,52$ $\mu\text{g/mL}$. ARLORIO *et al.* (2007) reporta en extracto metanólico en cacao no fermentado de Gana IC_{50} $30,100 \pm 2,41$ $\mu\text{g/mL}$, cacao de Ecuador no fermentado IC_{50} $14,986 \pm 2,41$ $\mu\text{g/mL}$, cacao de Costa de Marfil no fermentado IC_{50} $20,748 \pm 3,566$ $\mu\text{g/mL}$.

Con respecto a los granos no fermentados y secados para ambas variedades en esta etapa ya se pierde la eficiencia frente al radical DPPH, para el criollo a 2 días de secado degrada 8,6% y los 5 días 13,5%, para el CCN-51 a los 2 días 8,2% y a los 5 días 13,9%. Esta pérdida se puede aducir a lo indicado por HIL *et al.* (2009) donde indican que los métodos de secado afectan a los polifenoles especialmente el secado solar; OVACO y PINEDA (2011) indican que durante el secado de los granos de cacao se reduce la cantidad de

sustancias con propiedades antioxidativas principalmente por reacciones enzimáticas.

Del mismo cuadro y figura para los granos de cacao fermentados 2 y 6 días podemos apreciar que para ambas variedades también existe diferencia estadística significativa, para el caso del criollo a los 2 días de fermentación el IC_{50} $42,637 \pm 0,177$ $\mu\text{g/mL}$ a los 6 días IC_{50} $46,393 \pm 0,195$ $\mu\text{g/mL}$ y para el CCN-51 a los 2 días IC_{50} $41,596 \pm 0,241$ $\mu\text{g/mL}$ y a los 6 días IC_{50} $45,498 \pm 0,145$ $\mu\text{g/mL}$, como podemos apreciar que a medida que transcurre el tiempo de fermentación la capacidad antioxidante va disminuyendo. Al respecto GONZÁLEZ *et al.* (2012) durante la fermentación, la sacarosa y los componentes proteicos son parcialmente hidrolizados, los compuestos fenólicos oxidados y la glucosa es convertida en alcoholes y oxidada a ácido acético y ácido láctico. NAZARUDDIN *et al.* (2006) la epicatequina y la catequina se reduce aproximadamente 10-70% durante la fermentación.

Analizando el comportamiento de la capacidad antioxidante frente a este radical podemos apreciar que en el cacao criollo a los 2 días de fermentación degrada su capacidad 17% a los 6 días 27,4% con respecto al grano original, y para el cacao CCN-51 a los 2 días degrada 16,9 % y a los 6 días 27,8%, al respecto HUANCA (2010) en el cacao criollo degradó 21,4% y CCN-51 aumento 28,9% la capacidad antioxidante con relación al grano fresco. PORTILLO *et al.* (2007) del segundo hasta el quinto día de fermentación el contenido de taninos baja (2,5 a 4%), transformándose en sustancia de color pardo como consecuencia de una oxidación y de otros fenómenos químicos

que se aceleran al contacto con el aire; FORSYTH (1952) en la fermentación aeróbica, se forman pigmentos marrones a partir de polifenoles.

Comparando los resultados en grano fermentado criollo se encontró IC_{50} $46,393 \pm 0,195 \mu\text{g/mL}$ y CCN-51 IC_{50} $45,498 \pm 0,145 \mu\text{g/mL}$ comparando con lo citado por HUANCA (2010) en granos fermentados de cacao criollo IC_{50} $41,500 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ y en CCN-51 IC_{50} $49,977 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ y OTHMAN *et al.* (2005) indica que cada metabolito analizado tiene un comportamiento o solubilidad determinado.

Con respecto a los granos de cacao fermentado y secado 2 y 5 días tanto para el cacao criollo como el CCN-51 podemos apreciar que existe diferencia estadística significativa. Para el criollo fermentado y secado 2 días el IC_{50} $51,581 \pm 0,162 \mu\text{g/mL}$ y a los 5 días fue IC_{50} $53,587 \pm 0,105 \mu\text{g/mL}$, para el CCN-51 a los 2 días fue IC_{50} $50,370 \pm 0,161 \mu\text{g/mL}$ y a los 5 días fue IC_{50} $52,676 \pm 0,118 \mu\text{g/mL}$, esta variabilidad puede ser explicado por GONZÁLEZ *et al.* (2012) que indica en los granos secados sufren una fase anaeróbica hidrolítica, seguida por una condensación aeróbica, el grado de hidrólisis y oxidación varía entre las fermentaciones. ORTIZ *et al.* (2004) que indica que durante el secado continua la fase oxidativa de la fermentación y EFRAIM *et al.* (2009) dice que el tiempo requerido para la fermentación de semillas es variable de acuerdo con el material genético.

Cuadro 8. Resultados del IC₅₀ del radical DPPH de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

| Muestras | Trat. | Criollo µg/mL | % Deg. | CCN-51 µg/mL | % Deg. |
|--------------------------|-------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Fresco no fermentado | T1 | 36,410 ±0,152 ^g | 0 | 35,557±0,086 ^g | 0 |
| Fresco, secado 2 días | T2 | 39,557±0,135 ^f | 8,6 | 38,499±0,145 ^f | 8,3 |
| Fresco, secado 5 días | T3 | 41,342±0,197 ^e | 13,5 | 40,528±0,060 ^e | 14 |
| Fermentado 2 días | T4 | 42,637±0,177 ^d | 17,1 | 41,596±0,241 ^d | 17 |
| Fermentado 6 días | T5 | 46,393±0,195 ^c | 27,4 | 45,498 ±0,145 ^c | 28 |
| Fermentado-secado 2 días | T6 | 51,581±0,162 ^b | 41,7 | 50,370±0,161 ^b | 41,7 |
| Fermentado-secado 5 días | T7 | 53,587±0,105 ^a | 47,2 | 52,676±0,118 ^a | 48,1 |

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

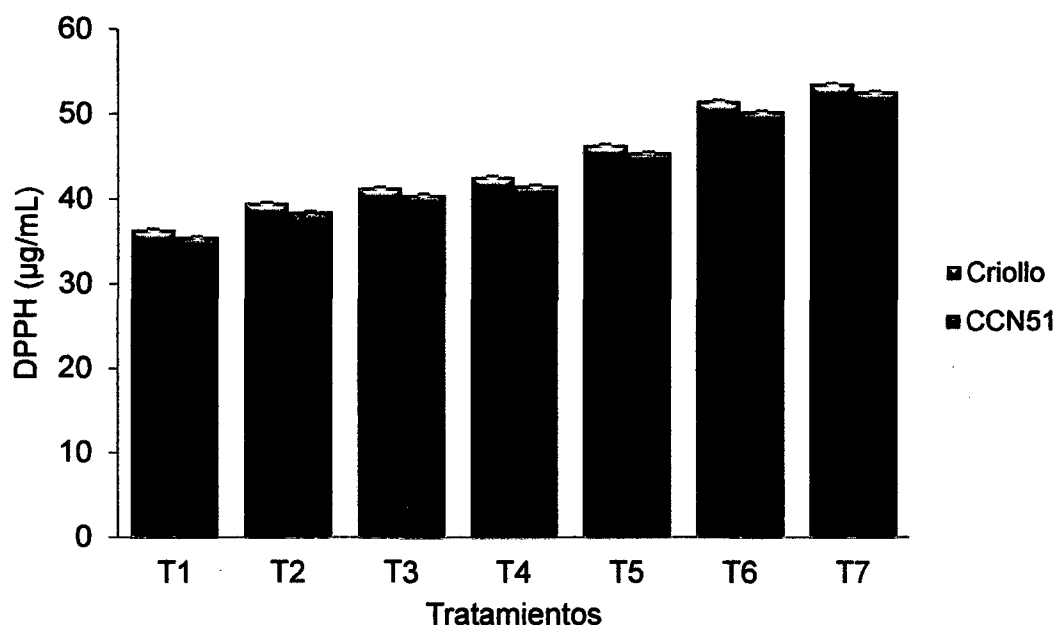


Figura 15. Comportamiento del IC₅₀ con el radical DPPH en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

En los granos de cacao fermentados y secados se puede apreciar que pierden eficacia frente al radical DPPH durante el proceso de beneficio, para el caso del cacao criollo fermentado y secado 2 días degradó 41,7% y a los 5 días 47,1% en el caso del cacao CCN-51 a los 2 días 41,6% y a los 5 días 48%, este comportamiento también es reportado por HUANCA (2010) cacao criollo degradó 18,5% y CCN-51 aumento 35,4% la capacidad antioxidante con relación al grano fresco. EL KAR *et al.* (2011) indican que la actividad antioxidante depende de los metabolitos secundarios que produce la planta y EFRAIM *et al.* (2009) cita que en las etapas de fermentación y secado, se producen las mayores pérdidas compuestos fenólicos presentes de forma natural.

Comparando los resultados en general entre los granos con y sin beneficio existe una pérdida de la actividad antioxidante, sin embargo el valor final se encuentra dentro del rango reportado por HUANCA (2010) respecto a la actividad antioxidante frente al radical DPPH del cacao criollo reportó IC_{50} $43,041 \pm 0,16$ $\mu\text{g/mL}$ y en CCN-51 IC_{50} $52,493 \pm 0,29$ $\mu\text{g/mL}$ en granos de cacao fermentado y secado. CONDEZO (2011) en granos comerciales buenos fluctuó el IC_{50} $51,310 \pm 0,47$ a $80,887 \pm 0,62$ $\mu\text{g/mL}$ y en granos defectuosos IC_{50} $58,420 \pm 0,64$ a $85,380 \pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$. CHAVEZ (2012) en grano de cacao comercial tuvo IC_{50} $53,044 \pm 0,507$ a $54,029 \pm 0,442$ $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2. Determinación del coeficiente de inhibición (IC_{50}) radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolino - 6- ácido sulfónico) (ABTS^{o+})

Analizando los resultados de los cacaos criollo y CCN-51 con y sin beneficio mediante el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 2x7x3 podemos indicar que se encontró diferencia estadística significativa y se presentan en (A-V).

Los resultados del IC_{50} en los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio se presenta en el cuadro 9 y figura 16 en ella podemos apreciar que entre los tratamientos existe diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) (A-Va) y (A-Vb), realizando la comparación de medias podemos apreciar la mayor eficiencia frente a este radical ABTS se encontró en el grano sin fermentar criollo IC_{50} $31,317 \pm 0,071 \mu\text{g/mL}$ y CCN-51 IC_{50} $30,101 \pm 0,061 \mu\text{g/mL}$, esta alta capacidad antioxidante puede deberse a lo explicado por BRUNA *et al.* (2009) quien indica que el árbol de cacao reacciona al stress del agua y la acumulación de aluminio y óxido férrico, también a la enfermedad del hongo *phytophthora* que afecta la putrefacción de la fruta, en esta reacción los flavonoides pueden ayudar a la planta a contrarrestar estos efectos, por esta razón los compuestos polifenólicos usualmente se acumulan en las partes externas de las plantas así como las cáscaras y piel. Así mismo, GONZÁLEZ *et al.* (2012) demuestra que los granos del cacao son ricos en antioxidantes específicos, con la estructura básica de las catequinas y epicatequinas. Hll *et al.* (2009) el cacao contiene variados contenidos de polifenoles y poseen diferentes niveles de los potenciales antioxidantes.

Del mismo cuadro y figura podemos indicar que el segundo lugar es ocupado por el grano de cacao fresco y secado 2 días para el criollo fue IC_{50} $32,736 \pm 0,172 \mu\text{g/mL}$ y cacao CCN-51 IC_{50} $31,220 \pm 0,070 \mu\text{g/mL}$ este comportamiento puede ser explicado por MAR *et al.* (2003) que indica que la concentración de polifenoles totales disminuido rápidamente durante el secado debido a la oxidación enzimática de los polifenoles. En esta etapa para el cacao criollo tuvo una degradación de 4,5% y el CCN-51 3,7% de su capacidad antioxidante con respecto al grano fresco, esto puede ser atribuido a lo indicado por ARLORIO *et al.* (2007) quien indica que las temperaturas de secado afectan el contenido de los antioxidantes y polifenoles que también varía en función al clon de cacao.

El tercer lugar fue ocupado por el grano de cacao fresco, secado 5 días en el cacao criollo el IC_{50} $34,541 \pm 0,149 \mu\text{g/mL}$ y CCN-51 IC_{50} $33,300 \pm 0,054 \mu\text{g/mL}$, la menor eficiencia frente al radical ABTS puede deberse a EFRAIM *et al.* (2009) que cita que la etapa de secado tiene como objetivo reducir la humedad de las almendras, haciéndolos estables al almacenamiento y JINAP *et al.* (2001) cita que la polifenol oxidasa es una enzima de cobre que, en presencia de oxígeno, cataliza dos reacciones diferentes: la hidroxilación de monofenoles a difenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de difenoles a quinonas (actividad difenolasa) y la temperatura óptima para su actividad es de alrededor de 45 °C. En esta etapa se aprecia una degradación de la capacidad antioxidante para el caso del criollo fue 10,3% y para el CCN-51 10,6%; cuanto mayor sea la temperatura de secado aumenta la oxidación de los polifenoles presentes en el cacao (EFRAIM *et al.*, 2009).

Cuadro 9. Resultados del IC₅₀ del radical ABTS^{°+} de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

| Muestras | Trat. | Criollo µg/mL | % Deg. | CCN-51 µg/mL | % Deg. |
|--------------------------|-------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Fresco no fermentado | T1 | 31,317 ±0,071 ^g | 0 | 30,101 ±0,061 ^f | 0 |
| Fresco, secado 2 días | T2 | 32,736±0,172 ^f | 4,5 | 31,220±0,070 ^e | 3,7 |
| Fresco, secado 5 días | T3 | 34,541±0,149 ^e | 10,3 | 33,300±0,054 ^d | 10,6 |
| Fermentado 2 días | T4 | 37,257±0,135 ^d | 18,9 | 36,203±0,116 ^c | 20,2 |
| Fermentado 6 días | T5 | 38,080±0,023 ^c | 21,5 | 37,071±0,038 ^b | 23,1 |
| Fermentado-secado 2 días | T6 | 38,763±0,124 ^b | 23,8 | 37,395±0,100 ^b | 24,2 |
| Fermentado-secado 5 días | T7 | 39,667±0,133 ^a | 26,7 | 38,639±0,040 ^a | 28,4 |

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

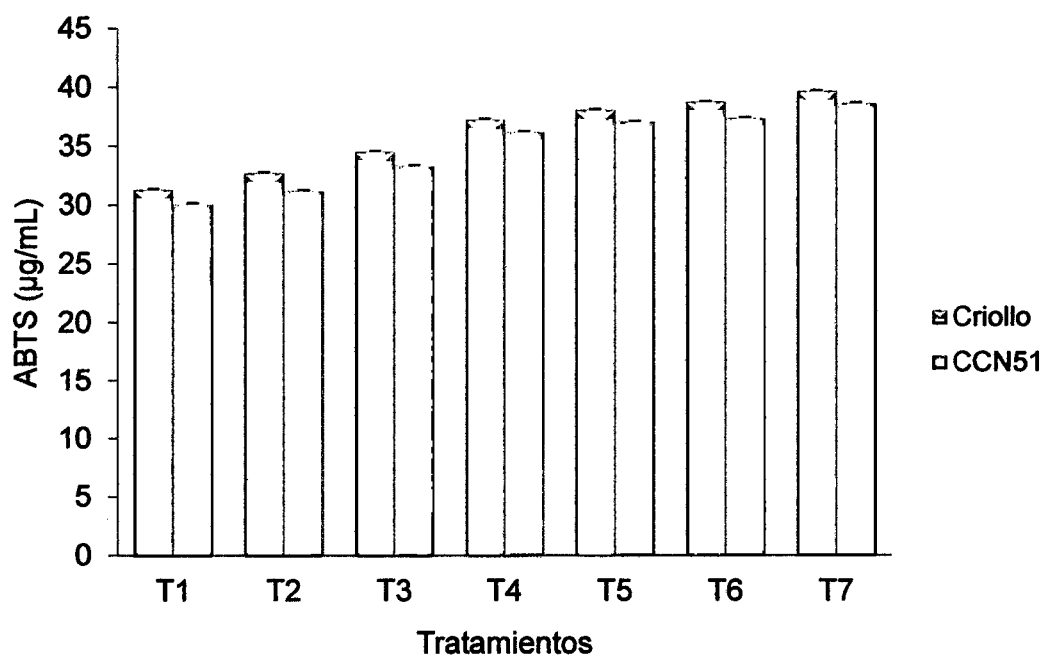


Figura 16. Comportamiento del IC₅₀ frente al radical ABTS en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

En el cuadro y figura sobre la evaluación de la capacidad antioxidante frente al radical ABTS los granos de cacao fermentados 2 días tuvieron una menor eficiencia, el criollo IC_{50} $37,257\pm 0,135\mu\text{g/mL}$ y cacao CCN-51 IC_{50} $36,203\pm 0,116\mu\text{g/mL}$, como podemos apreciar en ambos tipos de granos podemos apreciar una degradación con respecto al grano fresco, para criollo fue 18,9% y CCN-51 20,2%; este comportamiento es explicado por EFRAIM *et al.* (2009) que cita que la fermentación es un paso esencial para la obtención de almendras de buena calidad, debido a las reacciones bioquímicas complejas causando la muerte del embrión, la hidrólisis de azúcares y proteínas, la liberación de enzimas y sustratos, la difusión de compuestos fenólicos que entran en contacto con las enzimas. Así mismo NIEMENAK *et al.* (2006) indica que el contenido de compuestos fenólicos se degrada entre 14% y 25% (ICS84 y ICS1) y en los clones SNK413, IMC60, ICS95 se mantiene constante.

Según los resultados con respecto al tratamiento de granos de cacao fermentados 6 días el valor para el criollo fue IC_{50} $38,080\pm 0,023\mu\text{g/mL}$ y CCN-51 IC_{50} $37,071\pm 0,038\mu\text{g/mL}$, como podemos apreciar la eficacia frente al radical ABTS va decreciendo con respecto al grano fresco para el criollo 21,5% y para el CCN-51 23,1%, este comportamiento es explicado por AIKPOKPODION y DONGO (2010) indica que los polifenoles y la capacidad antioxidante se reducen durante la fermentación. ARLORIO *et al.*, (2007) indica con respecto al grano de cacao fermentado que el contenido de polifenoles disminuye porque éstas se difunden en los fluidos celulares, desde las células almacenadas y sufren oxidación por la condensación de moléculas de taninos;

MILLER *et al.* (2009) indica que la capacidad antioxidante puede ser afectada por proceso de fermentación porque decrece el contenido de flavonol en los granos de cacao.

Según los resultados de la fermentación y secado de los granos de cacao criollo y CCN-51, los mismos por 2 días podemos apreciar que la eficiencia de la capacidad antioxidante frente al radical ABTS sigue decreciendo para el criollo fue IC_{50} $38,763 \pm 0,124$ $\mu\text{g/mL}$ y cacao CCN-51 IC_{50} $37,395 \pm 0,100$ $\mu\text{g/mL}$, con respecto al valor inicial el cacao criollo decreció su capacidad en 23,8% y el CCN-51 24,2%, esta pérdida de eficiencia en la capacidad antioxidante puede ser explicado por JINAP *et al.* (2001) que durante el secado, la cantidad de polifenol se reduce sustancialmente por el pardeamiento enzimático, la polifenol oxidasa es una enzima muy importante en la oxidación de los granos de cacao, que empieza en la fermentación y continua su desarrollo a través del proceso de secado. MAR *et al.* (2003) los granos de cacao fermentados se secan con el fin de conservar el sabor a chocolate que desarrolló durante la fermentación y debe reducir el contenido de humedad del grano de cacao aproximadamente a 7%.

Finalmente la menor eficiencia se encontró en los granos de cacao fermentados 6 días y secado 5 días para el criollo fue IC_{50} $39,667 \pm 0,133$ $\mu\text{g/mL}$ y el CCN-51 IC_{50} $38,639 \pm 0,040$ $\mu\text{g/mL}$, como en todos los tratamientos en esta etapa se sufrió la mayor pérdida de eficiencia frente al radical ABTS para el criollo fue 26,7% y CCN-51 28,4%. CIENFUEGOS-JOVELLANOS *et al.*, (2009) indica que el decrecimiento del contenido de flavonoides después del proceso de fermentación en granos de cacao secados al sol, decrece 3-5 veces los

niveles de procianidinas.

De todos los tratamientos la mayor eficiencia frente al radical ABTS se encontró en los granos sin fermentar y la menor fue en los granos fermentados 6 días y secado 5 días, según CHAVEZ (2013) en granos comerciales de cacao seco fue IC_{50} 34,918 $\mu\text{g/mL}$. LEE *et al.* (2003) indica que el cacao tiene alta actividad antioxidante de compuestos fitoquímicos fenólicos expresados en equivalente de vitamina C, VCEACs 1128 mg frente al radical ABTS. OTHMAN *et al.* (2009), la capacidad antioxidante equivalente en trolox (TEAC) fue de 34,9 a 43,9 μmol de TEAC/100 g de cacao en extracto etanólico.

4.4. Evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

Los resultados de la evaluación sensorial referido a los sabores básicos, específicos y adquiridos realizados en las muestras de licor de cacao elaborados con granos fresco, fresco secado 5 días y fermentado secado 5 días, fueron analizados mediante componentes principales (A-VI) y (A-VII), según los resultados estadísticos podemos concluir que en el biplot de variables del primer componente (CP1) separa los atributos astringente y amargo de los demás atributos, el cual representa el 79,7% de la variabilidad total de los indicadores de la evaluación sensorial de la calidad de los granos fermentados y no fermentados (figura 17). Así mismo, los atributos ácido y astringente de los granos de cacao representan el 16,4% de la variabilidad del segundo componente (CP2) y en general ambos componentes representan el 96,1% de la variabilidad total.

De los resultados sobre el CP1 podemos indicar que los atributos astringente y amargo se presentan en granos de cacao frescos y no fermentado y secado, esto concuerda con JINAP *et al.* (2001) quien indica que los granos no fermentados no desarrollan ningún sabor a chocolate después del tostado y son excesivamente astringentes y amargos. RAMOS (2007) cita que los cacaos que no son fermentados desarrollan almendras pizarrosas y no desarrollan el sabor ni los aromas quedándose con un alto contenido de amargor y astringencia. Así mismo, un secado brusco, rápido y sin considerar el espesor de las camas (recomendable 5 cm) favorece a la formación de almendras ácidas. GONZÁLEZ *et al.* (2012) granos inmaduros y sin fermentar desarrollan poco sabor y aroma a chocolate luego del tostado, y la fermentación excesiva rinde aromas a jamón y pútridos no deseados.

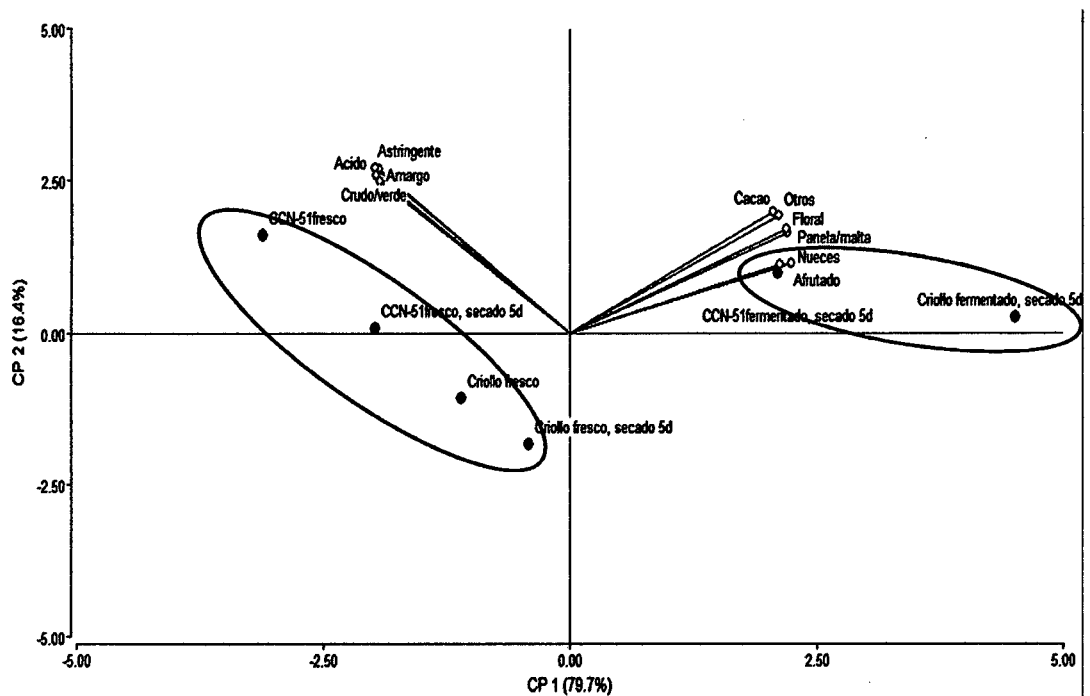


Figura 17. Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial en granos cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

Además en la figura 17, los grano del CCN-51 fresco y fresco secado 5 días son más astringentes, ácidos, amargos y crudos/verdes que los criollos con los mismos tratamientos, este comportamiento es explicado por NAVIA y PAZMIÑO, (2012) quienes citan que los criollos poseen un amargor suave, sabores ácidos y afrutados, son poco astringentes, poseen una sutileza y delicadeza aromática, pueden detectarse sabores a frutas ácidas (cítricos, frutas del bosque, etc.) y a pasas; el CCN-51 tiene una alta acidez, alto amargo y bajo sabor de chocolate. Además cabe resaltar según ELWERS *et al.*, (2009) que la amargura y la astringencia son componentes importantes del sabor de cacao y la amargura se puede atribuir en parte a las purinas. Así mismo, el amargor y la astringencia, que están dados en las almendras de cacao, es principalmente por la presencia de xantinas, alcaloides y polifenoles (MORILLO, 2005).

El CP2 fue representado por atributos de acidez y astringencia cuya variabilidad represento el 16,4%, estos atributo encontrados en los granos de cacao puede deberse a que en el experimento para los granos del CCN-51 y el criollo se estandarizo el tiempo de fermentado en 6 días, así mismo la forma de secado y el tiempo afecta grandemente la calidad del producto final. Según CARRILLO (2011) el secado con exposición al sol forma rápidamente una capa alrededor del grano que impide la salida del ácido acético, no logrando volatilizarse de manera adecuada y dejando un sabor ácido y astringente en las almendras. MAR *et al.* (2003) la reducción de la acidez y la astringencia es debido a la oxidación de los polifenoles a taninos insolubles. En tanto a la acidez según DIAZ y PINOARGOTA (2012) mencionan que el

contenido de ácidos orgánicos son compuestos que aportan al perfil sensorial del cacao, varía entre el 1,2% y 1,6%, algunos entre ellos el acético, cítrico y oxálico, se forman durante la fermentación.

Realizando el análisis estadístico mediante conglomerados de los tratamientos evaluados, podemos diferenciar dos grupos (figura 18); el primer grupo representa 33,4% (criollo fermentado y secado 5d y CCN-51 fermentado secado 5d); el segundo 2 representa 66,6% (criollo fresco, criollo fresco y secado 5d, CCN-51 fresco y CCN-51 fresco y secado 5d), como podemos apreciar existe una diferencia muy marcada entre un grano fermentado y secado y el no fermentado.

Con respecto a los grupos formados se puede decir que el primer grupo está conformado por los cacaos criollo y CCN-51 fermentado y secado cuyos calificativos fueron los valores más altos para sabor a cacao 2,2 y 2,5, afrutado 1,8 y 1,0, floral 1,5 y 1,0 nueces 2,2 y 0,7, panela/malta 1,8 y 1,3, otros 1,2 y 1,2, y el menor valor fue ácido 0,7 y 1,8, astringente 0,5 y 2,2, amargo 0,7 y 1,8, crudo/verde 0,3 y 1,3, todos los atributos desarrollados en los granos tanto en el criollo y el CCN-51 están refrendados por GONZÁLEZ *et al.* (2012) cita que durante la fase aeróbica ocurren reacciones mediadas por el oxígeno, tales como la oxidación de los complejos proteína-polifenol, este complejo reduce la astringencia y la amargura, el aroma afrutado en el cacao está fuertemente correlacionado con la acidez, y como se ha planteado aumenta en la etapa de fermentación; el aroma a fruta (y flores) también puede venir en forma de alcoholes superiores, producidos por las levaduras durante la fermentación. PORTILLO *et al.*, (2007) la disminución del contenido de taninos

durante la fermentación trae como consecuencia, una reducción del grado de amargor y astringencia del chocolate, a causa de la oxidación de estos compuestos, según SALVADOR (2008) el sabor a nuez y malta se deben principalmente al complejo polipeptidos-fenoles y pirazinas.

El segundo grupo está conformado por los granos de cacao criollo fresco, criollo fresco y secado 5d, CCN-51 fresco, CCN-51 fresco y secado 5d en ellos encontramos que poseen los atributos ácido 2,5; 1,5; 5,7 y 3,3, astringente 2,5; 1,5; 5,5 y 3,8, amargo 2,3; 1,8; 6,0 y 3,8, crudo/verde 1,2; 0,8; 2,0 y 1,8, pero no presentó sabor a cacao, floral, nueces, panela/malta y otros, solo se tiene un leve sabor afrutado en el criollo fresco y secado 5d.

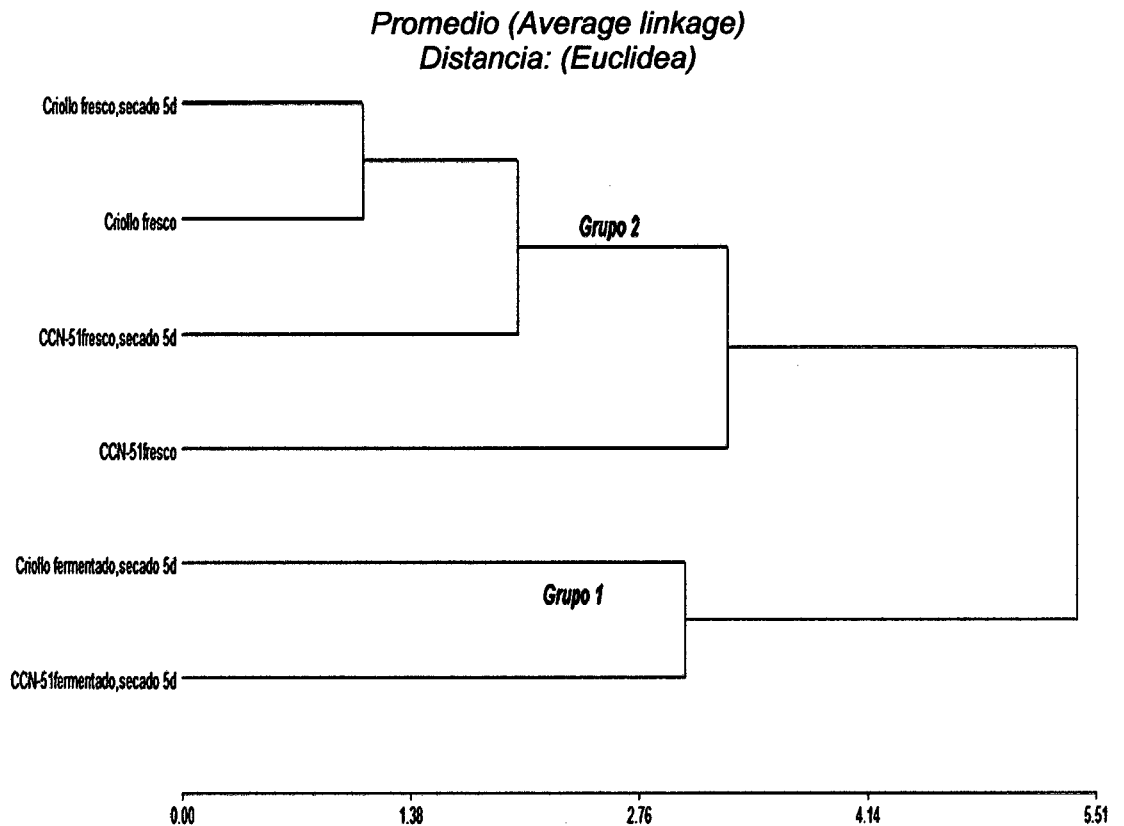


Figura 18. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de granos cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

De los resultados podemos indicar que el proceso de fermentación es muy importante para la calidad sensorial de los granos tal como indican FENGLIN *et al.* (2013) quien cita que fabricantes de cacao normalmente mezclan los granos no fermentados y parcialmente fermentados con granos completamente fermentados para obtener el sabor deseado características y para reducir la astringencia excesiva y la amargura. ASOCIACIÓN NATURLAND (2000) indica que del quinto al séptimo día de fermentación el olor a ácido acético de la masa de cacao es menos fuerte, luego disminuye y GONZÁLEZ *et al.* (2012) cita que la fermentación es esencial para el desarrollo de apropiados aromas a partir de precursores y las técnicas de fermentación pueden reducir las notas ácidas y maximizar el sabor y el aroma del chocolate.

V. CONCLUSIONES

- El mayor contenido de polifenoles totales correspondió al grano de cacao CCN-51 sin fermentar $9,196 \pm 0,015$ g EAG/100g y en menor fue para el grano fermentado 6 días y secado 5 días $6,561 \pm 0,164$ g EAG/100g.
- El mayor contenido de antocianinas se encontró en el grano de cacao CCN-51 sin fermentar y el menor al grano criollo fermentado 6 días y secado 5 días.
- La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS fue en granos de cacao criollo y CCN-51 sin fermentar.
- De la evaluación sensorial del licor de cacao se determinó dos grupos (criollo y CCN-51 fermentado y secado 5d) con predominio de cacao, floral, panela, nuez, afrutado y el segundo grupo (criollo y CCN-51 fresco, criollo y CCN-51 fresco y secado 5d) con atributos de astringencia, amargor y crudo.

VI. RECOMENDACIONES

- Para obtener granos de cacao con características sensoriales y color adecuado se debe realizar el beneficio, así mismo debe controlarse las etapas para no afectar el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante.
- Evaluar los polifenoles, antocianinas, capacidad antioxidante y sensorial de chocolates elaborados con la inclusión de nibs de cacao sin beneficio.
- Evaluar los polifenoles, antocianinas, capacidad antioxidante y sensorial de granos de cacao fresco, fermentado, secado, tostado, licor y chocolate.
- Establecer parámetros para la cosecha, fermentado, secado según la variedad del cacao con el fin de evitar la pérdida de sus propiedades funcionales y obtener buena calidad sensorial.

VII. ABSTRACT

TOTAL POLYPHENOLS, ANTHOCYANINS, ANTIOXIDANT SENSORY EVALUATION CAPACITY OF BEANS COCOA (*Theobroma cacao* L.) CRIOLLO AND CCN-51 WITH AND WITHOUT POST HARVEST

This research was developed in the laboratories of CIPNA and CIDBAM-UNAS. The objectives were: quantify total polyphenols, anthocyanin, antioxidant capacity by free radical DPPH and ABTS^{o+} and sensory analysis in cocoa beans criollo and CCN-51 with and without post harvest. For analysis of samples was prepared a hydroalcoholic extract. The results were analyzed by complete randomized design (DCA) with factorial arrangement (2x7x3) and the Tukey test ($p < 0.05$) for sensory evaluation multivariate analysis was used principal components. The cacao beans CCN-51 fresh unfermented had higher total polyphenol content $9,19 \pm 0,015$ g EAG/100g and the lowest was for beans criollo 6 days fermented and 5 days dried $6,01 \pm 0,007$ gEAG/100g. The highest content of anthocyanin in cocoa beans CCN-51 fresh unfermented $5,639 \pm 0,016$ and the lowest was criollo 6 days fermented and 5 days dried $0,946 \pm 0,008$ mg cyanidin-3-glucoside/g. The highest antioxidant capacity against radical DPPH and ABTS was presented CCN-51 fresh unfermented $IC_{50} 35,557 \pm 0,086$ μ g/mL and $IC_{50} 30,101 \pm 0,061$ μ g/mL and the lower criollo 6 days fermented and 5 days

dried IC_{50} $53,587 \pm 0,105$ $\mu\text{g/mL}$ and IC_{50} $39,667 \pm 0,133$ $\mu\text{g/mL}$. In the sensory evaluation two groups was found (criollo and CCN-51 with 6 days fermented and 5 days dried) predominant characteristics of cocoa, floral, brown sugar, nuts and fruity, the second (criollo and CCN-51 fresh, criollo and CCN-51 fresh 5 days dried) predominant characteristics of acid, astringent, bitter and raw.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AELSON, S., LIA, F., MARISA, A. 2009. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origen vegetale animal. *Quimica Nova*. 32:4849-4854.
- AFOAKWA, E. KONGOR, J. TAKRAMA, J. BUDU, A. 2012. Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *International Food Research Journal*. 20(4):1843-1853.
- AGUILERA, M., REZA, M., CHEW, R. y MEZA, J. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencia Biológicas y de la Salud, México*. XIII(2):16-22.
- AIKPOKPODION, P., DONGO, L. 2010. Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. *Int. J. Sustain. Crop Prod*. 5(4):66-70.
- ANDREW, R., DE SIMONE, F., PIZZA, C., CONTI, C., STEIN, M. 1989. Plants metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glicosydes from *Uncariatomentosa* and *Guetardaplaypoda*. *Journal of natural products*. 52:679-685.
- ÁNGEL, G. 2010. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Ed. por Médica Panamericana. 2ed. España. 786p.

- ARÉVALO, E. 2004. Cacao manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonía peruana. Ed. por Del Castillo. Chiclayo, Perú. p. 115-127.
- ARLORIO, M., LOCATELLI, M., TRAVAGLIA, F., COISSON, J., DEL GROSSO, E., MINASSI, A., APPENDINO, G., MARTELLI, A. 2007. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L). Food Chemistry. 106(2008):967-975.
- ARMIJOS, P. 2002. Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación. Tesis Lic. Química Analítica. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 77p.
- ASOCIACIÓN NATURLAND. 2000. Cacao, agricultura orgánica en el trópico y sub trópico. 1ed. Alemania. p. 10-15.
- AVELLO, M., SUWALSKY, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea. (494):161-172.
- BACELAR, L., FONSECA, M., FRANÇA, O., EDUARDO, S., DA SILVA, B. 2013. Phenolic compounds, methylxanthines and antioxidant activity in cocoa mass and chocolates produced from "witch broom disease" resistant and non resistant cocoa cultivars. Ciênc. Agrotec., Lavras. 37(3):244-250.
- BADUI, S. 1999. Química de los Alimentos. Ed. por Longman. México. 648 p.

- BADUI, S. 2006. Química de los Alimentos. Ed. por Enrique Quintanar Duarte. 4 ed. México. 736 p.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. WissTechnol.* 28:25-30.
- BRUNA, C., EICHHOLZ, I., ROHN, S., KROH, L., HUYSKENS-KEIL, S. 2009. Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) from different origins. *Journal of Applied Botany and Food Quality.* 83:9-13.
- CADENA, C. HERRERA, A. 2008. Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Tesis Químico. Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander. 66 p.
- CAMPOVERDE, C. 2010. Días de fermentación y frecuencia de remoción de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el genotipo nacional y clon CCN-51. Tesis Ing. Agrónomo. Ambato, Ecuador. Universidad Técnica de Ambato. 74 p.
- CARRILLO, A. 2011. Influencia del tiempo de fermentación y método de secado solar en la calidad sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon CCN-51. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 80 p.
- CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E., DEL MAR, Q. M., MUGUERZA, B., MOULAY, L., MIGUEL, M., ALEIXANDRE, A. 2009. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to

preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J. Agric. Food Chem.* 57(14):6156-6162.

CHÁVEZ, R. 2012. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao.

Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 83p.

CONDEZO, C. 2011. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y piróxilo) en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) comercial de Tingo María y Tocache. Tesis Ing. Industrias

Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 83p.

CROS, E. Factores condicionantes de la calidad del cacao. *In: Memorias del primer congreso venezolano del cacao y su industria* (12., 2000,

Macarav, Venezuela). 2000. Expediente. Macarav. Universidad Bicentenario de Aragua. p. 16- 28.

CUBERO, E., ENRÍQUEZ, G., HERNÁNDEZ, A., RODRIGUEZ, T. 1992.

Calidad del cacao en cuatro zonas cacaoteras de Costa Rica, Turrialba. 42(3):287-293.

CUBILLOS, G., MERIZALDE, G., CORREA, E. 2008. Manual de beneficio del cacao. Ed. por Antioquia. Colombia. 29 p.

DIAZ, S., PINOARGOTE, M. 2012. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN-51 tratado

enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Tesis Ing. de

- alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela superior politécnica del litoral. 145 p.
- EFRAIM, P., PEZOA-GARCÍA, N., JARDIM, D., NISHIKAWA, A., HADDAD, R., EBERLIN, M. 2009. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia Alimentos, Brasil*. 30(Supl.1):142-150.
- EL KAR, CH., FERCHICHI, A., ATTIA, F., BOUAJILA, J. 2011. Pomegranate (*Punica granatum*) juices: chemical composition, micronutrient cations and antioxidant capacity. *J Food Science*. 76(6):795-800.
- ELWERS, S., ZAMBRANO, A., ROHSIUS C., LIEBEREI, R. 2009. Differences between the content of phenolic compounds in criollo, forastero and trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *Eur Food Res Technol*. Hamburg, Germany. 229:937-948.
- ENRÍQUEZ, G. 1985. Curso sobre el cultivo de cacao. Ed. por Bib. Orton IICA. 1ed. Turrialba, Costa Rica. 239 p.
- ESPINOSA, J., MITE, F., CEDEÑO, S., BARRIGA, S., ANDINO, J. 2006. GIS-based site-specific management of cocoa. *Northern Latin American*. 90(1):36-39.
- FELLIGRINI, N., ROBERTA, K., YANG, M., 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.

- FENGLIN, G., LEHE, T., HUASONG, W., YIMING, F., FEI, X., ZHONG, CH., QINGHUANG, W. 2013. Comparison of cocoa beans from China, Indonesia and Papua New Guinea. *Foods*. 2:183-197.
- FENNEMA, O. 1993. *Química de los Alimentos*. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. 1095 p.
- FORSYTH, W. 1952. Cacao polyphenolic substances II changes during fermentation. *Biochemical Journal*. 51:516-520.
- FORSYTH, W., QUESNEL, V. 1957. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 8:505-509.
- GARCÍA, B., GARCÍA, G., ROJO, D., SÁNCHEZ, G. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 20(3):231-235.
- GARZÓN, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. *Acta Biológica. Colombia*. 13(3):27-36.
- GUILLIN, C., LARA, LL. 2010. Efecto de los sistemas de fermentación en la calidad del cacao de la variedad complejo nacional y trinitario (*Theobroma cacao* L.) del Cantón las naves provincia Bolívar. Tesis Ing. Agroindustrial. Guaranda, Ecuador. Universidad Estatal de Bolívar. 76 p.
- GONZALES, F. 2007. Cultivos industriales tropicales: cacao, café y palma aceitera. Tesis Ing. Agrónomo. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 103 p.

- GONZÁLEZ, M., PEREZ, S., PALOMINO, C. 2012. Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. *Actualización en nutrición, Venezuela*. 13(4):314-331.
- GUTIÉRREZ, A. 2002. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. *Acta farm. Bonaerense, Cuba*. 21(2):149-152.
- GUTIÉRREZ, S. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de... radicales libres?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, México*. 37(4):69-73.
- HANSEN, C., DEL OLMO, M., BURRI, C. 1998. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J. Sci. Food Agric*. 77(2):273-281.
- HEIM, K., TAGLIAFERRO, A., BOBILYA, D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structureactivity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10):572-584.
- HIL, C., LAW, C., SUZANNAH, S., MISNAWI, CLOKE, M. 2009. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *As. J. Food Ag-Ind*. 2(04):702-722.
- HUANCA, M. 2010. Polifenoles totales, catequina y actividad antioxidante en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y CCN-51 en las etapas de beneficio y tostado. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 83 p.
- IGLESIAS, N. 2009. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Tesis Químico. Galicia. España. Universidad de Santiago de Compostela. 176 p.
- JIMENEZ, J. 2006. Calidad sensorial de los cacaos especiales. Seminario taller internacional producción, calidad, mercadeos de cacaos especiales.

- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quevedo- Ecuador. p. 5.
- JINAP, S., BAKAR, J., NAZAMID, S. 2001. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:559-566.
- JONFIA-ESSIEN, W., WEST, G., ALDERSON, P., TUCKER, G. 2007. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry*. 108(2008):1135-1159.
- KOHKONEN, P., HOPIA, I., VOURELA, J., RAHUA, P., PIHLAJA, K., KUJALA, S., HEINONEN, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47(10):1347-1349.
- KUSKOSKI, E., ASUERO, M., GARCÍA-PARILLA, C., TRONCOSO, A. FETT, R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 24(4):691-693.
- LEBEAU, J., FURMAN, C., BERNIER, J., DURIEZ, P., TESSIER, E., COTELLE, N. 2000. Antioxidant properties of di-tert-butyl hydroxylated flavonoids. *Free Radical Biology and Medicina*. 29(9):900-912.
- LEE, K., KIM, Y., LEE, H., LEE, CH. 2003. Cocoa has phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem. Seul, Coreadel Sur*. 51(25):7292-7295.
- MANACH, E., WILLIAMSON, G., MORAND, C., SEAL, A., REMESY, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(Supp1):230-242.

- MAR, K., WAN, D., BAKAR, M., WAHID, S., HASSAN, K., MEOR, T. 2005. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*. 40:323-331.
- MARQUEZ, E. 2009. Contribución a la biología molecular de los genes antocianidina sintasa (*ans*) y sorbitol deshidrogenasa (*sdh*) en cultivares criollos y trinitarios de *Theobroma cacao* L. Tesis Lic. en biología. Universidad de los Andes. 98 p.
- MEURSING, E. 2008. De Zaan; cocoa manual. 40 ed. Suiza, Archer Daniels Midland Company. 168 p.
- MILLER, K., APGAR, J., SWEIGART, D., STUART, A., MCHALE, N., KONDO, M., HURST, W. 2009. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *J. of Food Sci. States Unites*. 74(6):398-404.
- MORALES, J., GARCÍA, J., MÉNDEZ, B. 2012. ¿Qué sabe usted acerca de...Cacao?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(4):79-81.
- MOREAU, C., BADELAR, L., EDUARDO, S., DA SILVA, B. 2013. Assessment of the fermentative process from different cocoa cultivars produced in Southern Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology*. 12(33):5218-5225.
- MORENO, L., SÁNCHEZ, J. 1989. Beneficio del cacao. Ed. por IICA. 1ed. Costa Rica. 26p.
- NAVIA, A., PAZMIÑO, N. 2012. Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN-51 a través de la adición de enzimas durante el proceso

- de fermentación. Tesis Ing. de alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 135 p.
- NAZARUDDIN, R., SENG, L.K., HASSAN, O. Y SAID. M. 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during fermentation. *Industrial Crops and Products*. 24(2006):87-94.
- NEGARESH, S., MARÍN, I. 2013. El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados. *Agroforestería en las Américas*. (49):93-98.
- NIEMENAK, N., ROHSIUS, CH., ELWERS, S., OMOKOLO, D., LIEBEREI, R. 2005. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(2006): 612–619.
- NOGALES, J., GRAZIANI DE FARIÑAS, L., ORTIZ DE BERTORELLI, L. 2006. Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentados en dos diseños de cajones de madera. *Agronomía Tropical*. 56(1):5-20.
- ORTIZ, L., CAMACHO, G., GRAZIANI, L. 2004. Efecto del secado al sol sobre la calidad del grano fermentado de cacao. *Agronomía Tropical, Venezuela*. 54(1):31- 43.
- ORTIZ, L., GRAZIANI, L., ROVEDAS, G. 2009. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical, Venezuela*. 59(2):119-127.

- ORTIZ, L., ROVEDAS, G., GRAZIANI, L. 2009. Influencia de varios factores índices físicos del grano de cacao en fermentación. *Agronomía Tropical, Venezuela*. 59(1):81-88.
- OTHMAN, A., ABBE, M., KIN, W., ISMAIL, A., NAWALYAH, A., ADENAN, I. 2009. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *African Journal of Biotechnology*. 9(7):1052-1059.
- OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N., ADENAN, I. 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*. 100(2007):1523-1530.
- OVACO, V., PINEDA, LL. 2011. Los residuos de cacao (*Theobroma cacao* L.) como fuente alternativa de antioxidantes. Tesis Ing. Industrias Agropecuarias. Loja, Ecuador. Universidad Católica de Loja. 42 p.
- PADILLA, C., RINCÓN, A., BOU-RACHED, L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 58(3):303-308.
- PEREA-VILLAMIL, J., CADENA-CALA, T., HERRERA-ARDILA, J. 2009. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*. 41:128-134.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research Intern*. 39(7):791-800.

- POO, B. 2005. Concentración de antocianinas en jugo de Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante nanofiltración. Tesis Ing. en Alimentos. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 62 p.
- PORTILLO, E., GRAZIANI DE FARINAS, L. Y BETANCOURT, E. 2007. Análisis químico del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el sur del lago de Maracaibo. Rev. Fac. Agron. 24: 522-546.
- QUINTANAR, E. CALDERON, S. 2009. La capacidad antioxidante total, bases y aplicaciones. Revista de Educación Bioquímica. 28(3): 89-101.
- RAMÍREZ, G., CELY, N., RAMÍREZ, S. 2013. Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas, México. Perspectivas en Nutrición Humana. México. 15(1):27-40.
- RAMIREZ, M., GERACITANO, L., MARTI-BARROS, D., HENRIQUES, A. 2009. Efectos beneficiosos de extractos de frutas rojas y de sus antocianos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 8(6):456-468.
- RAMOS, C. 2007. Programa de formación de catadores de cacao intermedio y avanzado, y talleres de capacitación a personal de asociaciones de productores. Ed. por Gladys Ramos Carranza. Lima, Perú. 27 p.
- RIMACHE, A. 2008. Cultivo del cacao. 1ed. Lima, Perú, Macro EIRL. 109 p.
- SALVADOR, G. 2008. Caracterización y distribución del cacao Blancom en la subcuenca del Rio Bigote. Tesis Ing. Agrónomo. Piura, Perú. Universidad Nacional de Piura. 73p.

- SALVADOR, N., GUTIERREZ, M. 2008. Mapeo de la calidad física y organoléptica del *Theobroma cacao* L. a nivel subcuenca del río bigote como estrategia para la inserción y posicionamiento en nichos de mercado de la asociación de pequeños productores de cacao de Piura. Tesis Ing. Agrónomo. Piura, Perú. Universidad Nacional de Piura. 133 p.
- SÁNCHEZ, C. 2007. Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfiles de sabor de interés comercial. Tesis Ing. Agrónomo. Quevedo, Ecuador. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 70 p.
- SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.; ANGELES, F.; MELCHOR, V.; CONDEZO, L. y MILLER, M. 2001. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidiummeyerii*). Food Chemistry. p. 1-23.
- SUAZO, Y. 2012. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao Nicaragüense. Memoria de investigación: Trabajo fin de máster. Pamplona. Universidad Pública de Navarra. 64 p.
- SULLCA, B. 1992. Tecnificación del cacao en la selva peruana. Ed. por Fundeagro. 1ed. Lima, Perú. p. 140-142.
- TOMAS-BARBERAN, F., CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E., MARIN, A., MUGUERZA, B., GIL-IZQUIERDO, A., CERDÁ, B., ZAFRILLA, P., MORILLAS, J., MULERO, J., IBARRA, A., PASAMAR, M., RAMON, D., ESPIN, J. 2007. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. J. Agric. Food Chem. Spain. 55(10):3926-3935.

- UGARTONDO, C. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. *J. Agric. Food Chem.* Barcelona, España. 54:6945-6950.
- VERDESOTO, E. 2009. Caracterización química preliminar de cacao (*Theobroma cacao* L.) de los municipios de Omoa y la Masica, Honduras. Tesis Ing. en Agroindustria Alimentaria. Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 66 p.
- WOOD, G. 1973. Cacao. Trad. por Antonio Marino. 1ed. México. Continental S.A. 355 p.
- ZAMORA E. 2007. Evaluación objetiva de la calidad sensorial de alimentos procesados. Ed. por Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. La Habana, Cuba. Editorial Universitaria. p. 80-109.
- ZAPATA, B., TAMAYO, T., ALBERTO, R. 2013. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Colombia. 18(3):391-404.
- ZHAO, J., WANG, J., CHEN, Y., AGARWAL, R. 1999. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*. 20(9):1737-1745.

IX. ANEXO

A-II. Análisis de varianza del contenido de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra) en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig |
|-------------------------|-----|-------------|--------------|----------------|--------------------|-----|
| Variedades | 1 | 8,55096 | 8,55096 | 910,58 | 0,0001 | ** |
| Etapas proceso | 6 | 25,74427 | 4,29071 | 456,91 | 0,0001 | ** |
| Variedad* etapa | 6 | 0,46221 | 0,07704 | 8,20 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 28 | 0,26294 | 0,00939 | | | |
| Total | 41 | 35,02039 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| R ² = 0,9925 | | CV = 1,2882 | MSE = 0,0969 | Media = 7,5228 | | |

A-IIa. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra) en granos de cacao criollo con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|-------------------------|-----|-------------|--------------|----------------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 11,44101 | 1,90684 | 2987,66 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 0,00894 | 0,00064 | | | |
| Total | 20 | 11,44995 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| R ² = 0,9992 | | CV = 0,3573 | MSE = 0,0253 | Media = 7,0716 | | |

A-IIb. Análisis de varianza de la cuantificación de polifenoles totales (g EAG/100 g muestra) en granos de cacao CCN-51 con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|-------------------------|-------------|--------------|----------------|---------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 14,76547 | 2,46091 | 135,64 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 0,25400 | 0,01814 | | | |
| Total | 20 | 15,01948 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| R ² = 0,9831 | CV = 1,6892 | MSE = 0,1347 | Media = 7,9740 | | | |

A-III. Análisis de varianza del contenido de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g de muestra) en los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig |
|-------------------------|-------------|--------------|----------------|---------|--------------------|-----|
| Variedades | 1 | 11,5676 | 11,5676 | 28731,1 | 0,0001 | ** |
| Etapas proceso | 6 | 53,7485 | 8,9580 | 22250,1 | 0,0001 | ** |
| Variedad* etapa | 6 | 3,8313 | 0,6385 | 1586,04 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 28 | 0,0112 | 0,0004 | | | |
| Total | 41 | 69,1587 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| R ² = 0,9998 | CV = 0,7925 | MSE = 0,0200 | Media = 2,5317 | | | |

A-IIIa. Análisis de varianza del contenido de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g de muestra) en los granos de cacao criollo con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|--------------------|-----|-------------|--------------|----------------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 16,45165 | 2,74194 | 6462,32 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 0,00594 | 0,00042 | | | |
| Total | 20 | 16,45759 | | | | |
| $R^2 = 0,9996$ | | CV = 1,0263 | MSE = 0,0205 | Media = 2,0069 | | |

A-IIIb. Análisis de varianza del contenido de antocianinas (mg cianidina-3-glucósido/g de muestra) en los granos de cacao CCN-51 con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|--------------------|-----|-------------|--------------|----------------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 41,12819 | 6,85470 | 17995,09 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 0,00533 | 0,00038 | | | |
| Total | 20 | 41,13352 | | | | |
| $R^2 = 0,9998$ | | CV = 0,6385 | MSE = 0,0195 | Media = 3,0565 | | |

A-IV. Análisis de varianza IC₅₀ del radical DPPH en granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig |
|-------------------------|-----|-------------|--------------|-----------------|--------------------|-----|
| Variedades | 1 | 9,86297 | 9,86297 | 136,39 | 0,0001 | ** |
| Etapas proceso | 6 | 1426,50117 | 237,75020 | 3287,83 | 0,0001 | ** |
| Variedad* etapa | 6 | 0,17721 | 0,02953 | 0,41 | 0,8671 | ** |
| Error experimental | 28 | 2,02473 | 0,07231 | | | |
| Total | 41 | 1438,56608 | | | | |
| R ² = 0,9986 | | CV = 0,6109 | MSE = 0,2689 | Media = 44,0165 | | |

A-IVa. Análisis de varianza IC₅₀ del radical DPPH en granos de cacao criollo con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|-------------------------|-----|-------------|--------------|-----------------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 718,87483 | 119,81247 | 1499,21 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 1,11884 | 0,07992 | | | |
| Total | 20 | 719,99367 | | | | |
| R ² = 0,9984 | | CV = 0,6353 | MSE = 0,2827 | Media = 44,5011 | | |

A-IVb. Análisis de varianza IC₅₀ del radical DPPH en granos de cacao CCN-51
con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|-------------------------|-------------|--------------|-----------------|---------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 707,80355 | 117,96726 | 1823,10 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 0,90590 | 0,06471 | | | |
| Total | 20 | 708,70945 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| R ² = 0,9987 | CV = 0,5843 | MSE = 0,2544 | Media = 43,5319 | | | |

A-V. Análisis de varianza IC₅₀ del radical ABTS en granos de cacao criollo y
CCN51 con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig |
|-------------------------|-------------|--------------|-----------------|---------|--------------------|-----|
| Variedades | 1 | 15,24506 | 15,24506 | 485,52 | 0,0001 | ** |
| Etapas proceso | 6 | 381,90265 | 63,65044 | 2027,14 | 0,0001 | ** |
| Variedad* etapa | 6 | 0,32606 | 0,05434 | 1,73 | 0,1507 | ** |
| Error experimental | 28 | 0,87918 | 0,03140 | | | |
| Total | 41 | 398,35295 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| R ² = 0,9978 | CV = 0,4999 | MSE = 0,1772 | Media = 35,4492 | | | |

A-Va. Análisis de varianza IC₅₀ del radical ABTS en granos de cacao criollo y con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|--------------------|---------------|----------------|-------------------|---------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 185,03562 | 30,83927 | 662,24 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 0,65195 | 0,04657 | | | |
| Total | 20 | 185,68757 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| $R^2 = 0,9965$ | $CV = 0,5986$ | $MSE = 0,2158$ | $Media = 36,0517$ | | | |

A-Vb. Análisis de varianza IC₅₀ del radical ABTS en granos de cacao CCN51 con y sin beneficio

| F.V. | G.L | S.C | C.M | F. cal. | P _{valor} | Sig. |
|--------------------|---------------|----------------|-------------------|---------|--------------------|------|
| Etapas de proceso | 6 | 197,19310 | 32,86552 | 2024,95 | 0,0001 | ** |
| Error experimental | 14 | 0,22723 | 0,01623 | | | |
| Total | 20 | 197,42032 | | | | |
| <hr/> | | | | | | |
| $R^2 = 0,9988$ | $CV = 0,3656$ | $MSE = 0,1274$ | $Media = 34,8467$ | | | |

A-VI. Resultados de la evaluación sensorial de los granos de cacao criollo y CCN-51 con y sin beneficio.

| MUESTRAS | Cacao | Ácido | Astringente | Amargo | Afrutado | Floral | Nueces | Panela/malta | Crudo/verde | Otros |
|-------------------------------|-------|-------|-------------|--------|----------|--------|--------|--------------|-------------|-------|
| Criollo fresco | 0.0 | 2.5 | 2.5 | 2.3 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.0 |
| Criollo fresco, secado 5d | 0.0 | 1.5 | 1.5 | 1.8 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 0.0 |
| Criollo fermentado, secado 5d | 2.2 | 0.7 | 0.5 | 0.7 | 1.8 | 1.5 | 2.2 | 1.8 | 0.3 | 1.2 |
| CCN-51fresco | 0.0 | 5.7 | 5.5 | 6.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 0.0 |
| CCN-51fresco, secado 5d | 0.0 | 3.3 | 3.8 | 3.8 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.8 | 0.0 |
| CCN-51fermentado, secado 5d | 2.5 | 1.8 | 2.2 | 1.8 | 1.0 | 1.0 | 0.7 | 1.3 | 1.3 | 1.2 |

A-VII. Autovectores del análisis multivariado

| Autovectores | | |
|--------------|----------------|----------------|
| VARIABLES | e ¹ | e ² |
| Cacao | 0,31 | 0,30 |
| Ácido | -0,29 | 0,41 |
| Astringente | -0,30 | 0,41 |
| Amargo | -0,30 | 0,39 |
| Afrutado | 0,34 | 0,17 |
| Floral | 0,34 | 0,25 |
| Nueces | 0,32 | 0,17 |
| Panela/malta | 0,33 | 0,26 |
| Crudo/verde | -0,29 | 0,38 |
| Otros | 0,32 | 0,29 |

A-VIII. Correlaciones con las variables originales.

| Correlaciones con las variables originales | | |
|--|-------|------|
| VARIABLES | CP 1 | CP 2 |
| Cacao | 0,88 | 0,39 |
| Ácido | -0,83 | 0,52 |
| Astringente | -0,85 | 0,53 |
| Amargo | -0,85 | 0,50 |
| Afrutado | 0,96 | 0,22 |
| Floral | 0,95 | 0,32 |
| Nueces | 0,91 | 0,22 |
| Panela/malta | 0,94 | 0,33 |
| Crudo/verde | -0,83 | 0,48 |
| Otros | 0,91 | 0,37 |