

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

**ESCUELA PROFESIONAL DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
DE ALIMENTOS**



**EVALUACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES, ANTOCIANINAS,
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y SENSORIAL EN CHOCOLATE
“BITTER” CON “NIBS” FERMENTADOS Y NO FERMENTADOS**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

DELGADO VÁSQUEZ, Jessica Danae

PROMOCIÓN 2013 – I

Tingo María – Perú

2016

DEDICADO

A DIOS:

Agradecerle por la infinita bondad que tiene conmigo y permitirme cumplir una meta más y ser mejor cada día.

A MIS ABUELOS:

JULIA ROMERO, CARMEN MACAHUACHI, RAÚL DELGADO Y PEDRO VÁSQUEZ, por su gran amor, consejos y valores que me brindaron desde niña, por la confianza que siempre tuvieron en mí, por estar siempre acompañando física o espiritualmente en cada momento de mi vida.

A MI MADRE:

NELLY VÁSQUEZ MACAHUACHI, gracias por el gran esfuerzo que realizaste cada día para poder cumplir mis metas, por la confianza que tuviste siempre en mí, por tu gran amor, comprensión, apoyo, paciencia y tus oraciones, y también por inculcarme valores para ser una mejor persona y así lograr forjarme un camino en la vida.

A MI PADRE:

CARLOS DELGADO ROMERO, gracias por el amor, la comprensión y confianza que me brindaste.

AGRADECIMIENTO

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

A la Empresa Agroindustrial Makao Perú S.A.C., por brindarme la oportunidad y el apoyo para desarrollo de este proyecto.

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

A mi co-asesora la Ing. Jenny Mandujano Paredes, por el apoyo, conocimiento y paciencia ofrecida durante el desarrollo de este proyecto.

Al Ing. Mendis Paredes e Ing. Normando Salvador, por las muestras otorgadas para la ejecución de este proyecto.

A la Ing. Aurelia León, Ing. Darlym Reátegui, Ing. Arturo Urrelo, Ing. Tomás Menacho, Téc. Glelia Ríos, Téc. Celedonio Yacha, Téc. Richard Fias, Téc. César Huaccha, Sra. Maritza y Sra. Netza, por su apoyo, conocimiento, amistad y buen humor brindado durante la ejecución de este proyecto.

A toda mi familia, en especial a mi mamá Nelly Vásquez, por apoyarme, aconsejarme, alentarme, brindarme su amor y estar siempre a mi lado cuando más los necesito.

A mis amigos: Celinda Huaccha, por otorgarme su amistad y compañía cada momento; Andy Ortega, Jerson Mays y Mijael Cabrera, por su apoyo y compañía en los laboratorios; Richard Pezo, Alejandro Nieves, Yovana Parra, Kattu y Kelly Castillo, Dan Pizarro y todos aquellos que de alguna manera apoyaron para la culminación de esta meta

INDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aspectos generales del grano y pasta de cacao	3
2.1.1. Origen y distribución	3
2.1.2. Taxonomía	4
2.1.3. Variedades de granos	5
2.1.4. Composición química del grano fresco	6
2.1.5. Composición química del grano fermentado y seco	7
2.1.6. Proceso de obtención de pasta de cacao	8
2.1.7. Composición química de la pasta de cacao	10
2.2. Aspectos generales del chocolate	10
2.2.1. Definición	10
2.2.2. Clasificación	11
2.2.3. Proceso de elaboración	12
2.2.4. Sentidos y degustación del chocolate	15
2.3. Generalidades de polifenoles totales	17
2.3.1. Polifenoles totales	17
2.3.2. Polifenoles en el cacao y chocolate	19
2.4. Generalidades de antocianinas	22
2.4.1. Antocianinas	22
2.4.2. Antocianinas en el cacao y chocolate	22

	Pág.
2.5. Generalidades de capacidad antioxidante	23
2.5.1. Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	24
2.5.2. Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS ⁰⁺) ...	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Lugar de ejecución	27
3.2. Materia prima	27
3.3. Materiales y equipos de laboratorio y/o proceso, reactivos y solventes	28
3.3.1. Materiales de laboratorio y/o proceso	28
3.3.2. Equipos de laboratorio y/o proceso	28
3.3.3. Reactivos y solventes	29
3.4. Métodos de análisis	29
3.5. Metodología experimental	30
3.5.1. Obtención de los nibs fermentados y no fermentados	30
3.5.1.1. Nibs fermentados	30
3.5.1.2. Nibs no fermentados	32
3.5.2. Distribución de los tratamientos	33
3.5.3. Elaboración de chocolate bitter con nibs de tres variedades fermentados y no fermentados	34
3.5.4. Preparación del extracto hidroalcohólico	36

	Pág.
3.5.5. Cuantificación de polifenoles totales en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	37
3.5.5.1. Determinación de la curva estándar	37
3.5.5.2. Cuantificación de polifenoles totales	38
3.5.6. Cuantificación de antocianinas en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	38
3.5.7. Determinación de la capacidad antioxidante en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	40
3.5.7.1. Capacidad de inhibir radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	40
3.5.7.2. Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS ⁰⁺) ...	43
3.5.8. Evaluación sensorial de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
4.1. Evaluación de polifenoles totales en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	48
4.1.1. Determinación de la curva estándar	48
4.1.2. Cuantificación de los polifenoles totales en los chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	49
4.2. Cuantificación de antocianinas en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	53

	Pág.
4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	56
4.3.1. Coeficiente de inhibición (IC ₅₀) del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	56
4.3.2. Coeficiente de inhibición (IC ₅₀) del radical libre 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS ⁰⁺)	60
4.4. Evaluación sensorial de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	64
V. CONCLUSIONES	78
VI. RECOMENDACIONES	79
VII. ABSTRACT	80
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
IX. ANEXOS	96

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Grupos de cacao y distribución geográfica	4
2. Composición fisicoquímica promedio de granos frescos de cacao de tres variedades	7
3. Composición química de almendras de cacao fermentadas y secas	8
4. Composición química de la pasta de cacao	10
5. Principales compuestos polifenólicos	18
6. Contenido polifenólico en semillas de cacao	20
7. Concentraciones utilizadas para el análisis de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH	42
8. Preparación de soluciones de trabajo	43
9. Concentraciones utilizadas para el análisis de la capacidad antioxidante frente al radical ABTS ⁰⁺	45
10. Preparación de soluciones de trabajo	46
11. Cuantificación de polifenoles totales en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	51
12. Cuantificación de antocianinas en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	54
13. Resultados del IC ₅₀ del radical DPPH en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	57
14. Resultados del IC ₅₀ del radical ABTS ⁰⁺ en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados	62

Pág.

15. Promedio del perfil sensorial de las muestras de chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados	66
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Diagrama de proceso de obtención de pasta de cacao	9
2. Diagrama de proceso de obtención de chocolate amargo	14
3. Estructura básica de los flavonoides	19
4. Principales polifenoles que se encuentran en <i>Theobroma cacao</i>	21
5. Catequinas que se encuentran en pequeñas cantidades en el cacao	21
6. Esquema general de la reacción de transformación de procianidinas a antocianinas	22
7. Estructura del radical DPPH	24
8. Estructura del ABTS ⁰⁺	26
9. Diagrama del proceso para obtención de nibs de cacao fermentados	32
10. Diagrama del proceso para obtención de nibs de cacao no fermentados	33
11. Diagrama de elaboración de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	35
12. Diagrama de flujo para la preparación del extracto hidroalcohólico del chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	36
13. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales	48
14. Representación del contenido de polifenoles totales en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	51
15. Representación del contenido de antocianinas en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	54

16. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical DPPH en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	58
17. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante	60
18. Comportamiento del IC ₅₀ con el radical ABTS ⁰⁺ en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	62
19. Perfil sensorial de las muestras de chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados	67
20. Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	74
21. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados	76

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
I. Procedimiento para la determinación de la curva estándar	97
II. Ficha de evaluación sensorial de chocolate bitter de 60%	98
III. Distribución de los tratamientos para la evaluación sensorial	99
IV. Resultados de las absorbancias de la curva estándar de polifenoles ...	100
V. Análisis de varianza de contenido de polifenoles totales en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados	100
VI. Análisis de varianza de contenido de antocianinas en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados	101
VII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical DPPH en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados	101
VIII. Análisis de varianza de IC ₅₀ del radical ABTS ⁰⁺ en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados	102
IX. Análisis de componentes principales de los atributos del chocolate – matriz de correlación/coeficientes	103
X. Análisis de componentes principales de los atributos del chocolate – correlaciones con las variables originales	104

RESUMEN

Los objetivos del trabajo fueron: Determinar los polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante (DPPH y ABTS⁰⁺) y evaluar sensorialmente el chocolate bitter con nibs de cacao fermentados y no fermentados. Los chocolates elaborados incluyeron 7% de nibs de cacao fermentado y no fermentados de las variedades CCN-51, porcelana y criollo. Se preparó un extracto hidroalcohólico, 3 g de muestra (desgrasada) en 30 mL (50:50 v/v), macerado 24 h, filtrado y centrifugado (10000 rpm/10min/4°C). Los resultados se analizaron mediante el diseño completo al azar (DCA) y prueba de Tukey ($p < 0,05$), en la evaluación sensorial se utilizó un análisis descriptivo cuantitativo (QDA) y análisis multivariado con componentes principales (ACP). Los chocolates con nibs de cacao CCN-51, porcelana y criollo no fermentado presentaron mayor contenido de polifenoles totales y el menor contenido los chocolates sin nibs y con nibs fermentados. Los nibs de cacao CCN-51 y criollo no fermentado presentaron el mayor contenido de antocianinas. La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS⁰⁺ se presentó en chocolates con nibs de cacao CCN-51, criollo y porcelana no fermentado (IC_{50} 0,172±0,002, 0,189±0,004, 0,196±0,004 y 0,053±0,002, 0,054±0,002, 0,055±0,002 mg/mL respectivamente). En la evaluación sensorial se encontraron tres grupos: En el primer grupo (nibs CCN-51 y criollo fermentado y nibs CCN-51 no fermentado) predominaron todos los atributos, en el segundo (nibs criollo y porcelana no fermentado) resaltó el amargor y en el tercero (nibs porcelana fermentado) predominó la astringencia y el aroma floral.

I. INTRODUCCIÓN

El chocolate es una matriz alimenticia apreciada por el consumidor a través de la cual se puede suministrar componentes benéficos para la salud. Así mismo constituye un alimento funcional gracias a la presencia de compuestos antioxidantes llamados polifenoles. Los flavonoides del cacao son una categoría de polifenoles que constituye un potente antioxidante para las células. El chocolate se origina de los granos del fruto de la planta del cacao (*Theobroma cacao* L.), producidos en la amazonia peruana es un cultivo que tiene buena producción, especialmente en el Valle del Bajo Huallaga, en la actualidad este cultivo tiene importancia por su alto valor comercial a nivel mundial.

Según Leatherhead Food Research los tres principales países consumidores de chocolate en el 2012 basado en el consumo per cápita fueron Suiza (11,9 Kg), Irlanda (9,9 Kg) y Reino Unido (9,5 Kg), mientras que en el Perú el consumo por peruano es apenas de 600 g/año, cabe resaltar que los chocolates de mayor preferencia son los que tienen alto dulzor y menor contenido de licor de cacao. El chocolate (en algunas regiones también descrito como chocolate amargo o bitter, chocolate semidulce o chocolate oscuro) debe incluir en la formulación 35% de licor de cacao y 14% manteca de cacao como mínimo, además se puede incluir frutas secas y nibs de granos fermentados

para garantizar las características organolépticas deseadas, pero los nibs de cacao sin fermentar son lo que aportan más antioxidantes, obteniendo así un producto funcional, ya que es una rica fuente de antioxidantes (catequinas, epicatequinas, procianidinas y polifenoles), estos antioxidantes naturales reducen el número de radicales libres en el cuerpo y proveen defensas contra los especies reactivos de oxígeno (ROS). Bajo este marco se planteó la investigación considerándose los siguientes objetivos:

- Cuantificar el contenido de polifenoles totales y antocianinas en los chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados.
- Determinar la capacidad antioxidante mediante los radicales libres DPPH y ABTS⁰⁺ en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.
- Evaluar sensorialmente el chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos generales del grano y pasta de cacao

2.1.1. Origen y distribución

Como cultivo, el cacao se llevó de Brasil a la colonia portuguesa de Príncipe en 1822 y de ahí a la isla Sao Tomé en 1830, ambas en el Golfo de Guinea; posteriormente, gracias a la corona británica; Ghana obtiene el cacao en 1869 y por el año de 1951 se extiende al oeste de África, donde actualmente la producción mundial alcanza un 60% (ADRIAZOLA, 2003).

En la cuenca alta del río Amazonas, es en donde se presenta la mayor variabilidad de esta especie. Las poblaciones de Centroamérica y norte de Sudamérica conforman el grupo racial llamado “criollo” y aquellos de la cuenca del Amazonas forman el grupo “forastero”, tal como se muestra en el Cuadro 1 (CHIA, 2009).

Cuadro 1. Grupos de cacao y distribución geográfica.

Grupo de cacao	Distribución geográfica
Criollo ancestrales	Sur de México.
Criollos modernos	América Central, Colombia y Venezuela.
Amazonas o Forastero del alto amazonas	Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia y Brasil.
Guyanas o Forastero del bajo amazonas	Meseta de las Guyanas, Venezuela, Surinam, Guyana Francesa y Brasil.
Nacional	Zona costera del Ecuador.

Fuente: CHIA (2009).

2.1.2. Taxonomía

Según RIERA (2009), la ubicación taxonómica de la especie es:

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Dileniidae
Orden	: Malvales
Familia	: Sterculiaceae
Género	: Theobroma
Especie	: <i>Theobroma cacao</i>

2.1.3. Variedades de granos

El cacao como cualquier otra planta posee diversas variedades lo que influye en sus propiedades y hace que los aromas varíen:

- **Porcelana:** Es considerado un cacao criollo, las semillas son redondeadas o simétricas, los cotiledones son de color blanco o rosado pálido (CHACÓN *et al.*, 2011) y son considerados como cacao fino o aromático (PORTILLO *et al.*, 2006).
- **CCN-51 (Colección Castro Naranjal):** También se pueden encontrar clones, es decir variedades producidas por el hombre, que suelen identificarse con letras y números provenientes de su investigación, como es el caso del CCN-51. Sus mazorcas tiernas son de color rojiza-morada y cuando están maduras son de color rojizo-anaranjado. Es tolerante a las enfermedades, de alta productividad y calidad. Según las notas de cata posee una alta acidez, alto amargor y bajo sabor a chocolate (NAVIA y PAZMIÑO, 2012).
- **Criollo:** Son árboles relativamente bajos y menos robustos respecto a otras variedades, su copa es redonda con hojas pequeñas de forma ovalada, de color verde claro y gruesas; las almendras son de color blanco marfil. Este tipo de cacao se caracteriza por tener mazorcas alargadas de colores verde y rojizo en estado inmaduro, tornándose amarillas y anaranjadas rojizas cuando están maduras, el chocolate obtenido de este cacao es apetecido por el sabor a nuez y fruta; comercialmente se enmarca dentro de los cacaos finos. Según las notas de cata poseen un amargor suave, sabores ácidos y

afrutados (cítricos, frutas del bosque, entre otros), son poco astringentes, poseen una sutileza y delicadeza aromática (NAVIA y PAZMIÑO, 2012).

2.1.4. Composición química del grano fresco

Según RODRÍGUEZ (2011), reporto que los granos de cacao fresco estaban constituidos principalmente por lípidos, cuyo contenido fue significativamente diferente en las tres variedades: Criollo, forastero y trinitario. La variedad forastero presentó el menor contenido de lípidos, mientras que la variedad trinitario presentó la mayor concentración. Otros componentes importantes en el cacao (Cuadro 2) son las proteínas y los taninos, dichos compuestos intervienen en las reacciones bioquímicas que ocurren durante la fermentación y el secado del grano, contribuyendo en la formación de precursores del sabor. Además, el pH, acidez titulable, azúcares totales, azúcares reductores y cenizas no presentaron diferencias significativas en las tres variedades.

Cuadro 2. Composición fisicoquímica promedio de granos frescos de cacao de tres variedades.

Componente	Variedad		
	Forastero (%)	Criollo (%)	Trinitario (%)
Humedad	36,87	36,36	35,86
pH	6,36	6,39	6,35
Acidez titulable	0,31	0,31	0,35
Taninos	0,80	0,68	0,72
Azúcares reductores	3,24	3,02	2,90
Azúcares totales	8,07	8,05	7,62
Proteína	13,59	13,88	13,97
Cenizas	3,59	3,67	3,63
Grasas	49,52	50,99	52,24

Fuente: RODRIGUEZ (2011).

2.1.5. Composición química del grano fermentado y seco

Según WAKAO (2002), la composición química de los granos de cacao (Cuadro 3) depende de varios factores como: Tipos de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación y el secado. El beneficio poscosecha también influye sobre su composición química.

Cuadro 3. Composición química de almendras de cacao fermentadas y secas.

Componentes	Fermentado y seco (%)	Cáscara (%)	Germen o radícula (%)
Agua	5,00	4,50	8,50
Grasa	54,00	1,50	3,50
Cafeína	0,20	-	-
Teobromina	1,20	1,40	-
Polihidroxifenoles	6,00	-	-
Proteínas bruta	11,50	1,90	25,10
Mono-oligosácaridos	1,00	0,10	2,30
Almidón	6,00	-	-
Pentosanos	1,50	7,00	-
Celulosa	9,00	26,50	4,30
Ácidos carboxílicos	1,50	-	-
Otras sustancias	0,50	-	-
Cenizas	2,60	8,00	6,30

Fuente: CALDERÓN (2002).

2.1.6. Proceso de obtención de pasta de cacao

Según DÍAZ y PINOARGOTE (2012), para la obtención de pasta de cacao se utiliza el siguiente diagrama de proceso, tal como se muestra en la Figura 1.

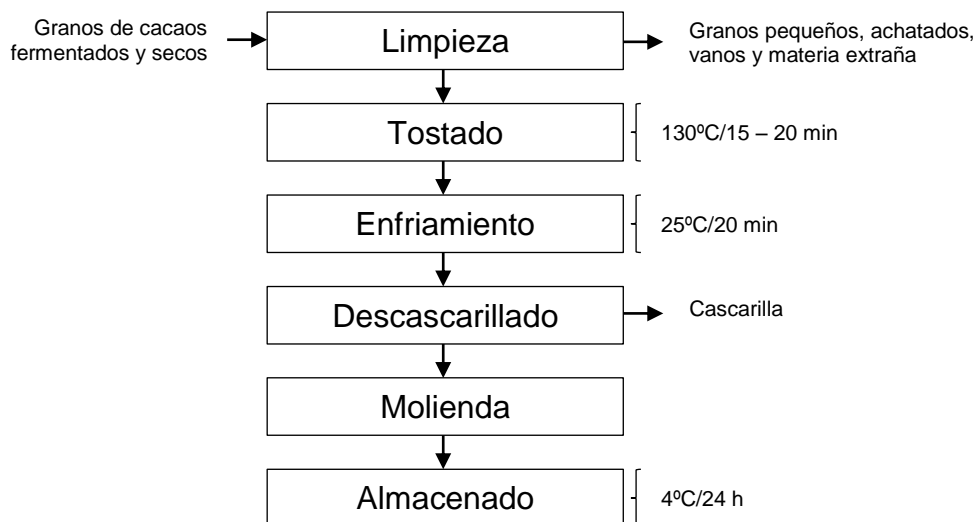


Figura 1. Diagrama de proceso de obtención de pasta de cacao.

- **Limpieza:** Los granos llegan con una serie de impurezas como granos pequeños, achatados, vanos y materia extraña (piedras, hojas, cáscaras, tallos), lo que baja la calidad del producto, por tal motivo es necesario eliminarlas (HERNANDEZ, 2010).
- **Tostado:** Después de limpiar el cacao, éstos se tuestan para ayudar a desarrollar todas sus cualidades aromáticas y de sabor. El proceso de tostado se lleva a cabo alrededor de 130°C/15 – 20 min (OLIVERAS, 2007).
- **Enfriamiento:** Se enfría a 25°C/20 min para que no haya una pérdida de aroma (HERNANDEZ, 2010).
- **Descascarillado:** Es el proceso en el que se elimina la cáscara la cual constituye a la cubierta exterior de la semilla del cacao (LIENDO, 2005). Consiste en pasar los granos primero por una máquina que estruja la semilla para que libere la cascarilla, estas máquinas impulsan los granos sobre

placas de impacto a grandes velocidades, provocando la ruptura (BECKETT, 2002).

- **Molienda:** Los nibs de cacao se muelen para producir a pasta de cacao; luego las partículas del cacao son suspendidas en manteca de cacao fundido. La temperatura y la intensidad de la molienda fluctúa, según el tipo de semilla de cacao empleada y de las especificaciones del diseño exigido para el producto final (LIENDO, 2005).
- **Almacenado:** Se almacena en sitios secos a 4°C/24 h (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012).

2.1.7. Composición química de la pasta de cacao

La composición química de la pasta de cacao puede ser afectada por diversos factores como la variedad, el clima, el suelo y otros (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composición química de la pasta de cacao.

Componente	Porcentaje (%)
Grasa	55
Carbohidratos	17
Proteína	11
Teobromina	1,5

Fuente: HERNANDEZ (2010).

2.2. Aspectos generales del chocolate

2.2.1. Definición

Se obtiene mezclando azúcares con dos productos derivados del cacao: Pasta de cacao (parte sólida) y manteca de cacao (parte grasa). A partir

de esta combinación básica, se elaboran los distintos tipos de chocolate y de su mezcla o no con otros productos (leche y frutos secos) (RAMÍREZ, 2011). Son sólidos a 20 – 27°C y se derriten a temperatura corporal (37°C) durante su consumo. A pesar del alto contenido de lípidos y azúcar, contribuye positivamente en la nutrición humana debido a la provisión de antioxidantes, principalmente polifenoles, incluyendo flavonoides como epicatequinas, catequinas y procianidinas (AFOAKWA, 2010).

2.2.2. Clasificación

Según AFOAKWA (2010), la variedad depende de las proporciones de carbohidratos, grasa y proteínas, la clasificación principal del chocolate es:

- **Chocolate bitter o dark:** Contiene una gran cantidad de pasta de cacao, que le da un sabor más amargo, comparado con el chocolate de leche que es suave y dulce, por esta razón, se le conoce como chocolate amargo. Para este tipo de chocolate, el mínimo exigido de cacao es 60%, el chocolate negro de alta calidad se caracteriza por su bajo contenido de azúcar (JARRÍN, 2010).
- **Chocolate de leche:** Debe contener por lo menos 40% de cacao, 20% de leche y 3,7% de grasa vegetal, para que sea considerado como un chocolate de leche, generalmente se mezcla con vainilla, azúcar y lecitina. Este chocolate es usado en la fabricación de pasteles, pyes y otros postres, su sabor dulce le da esa preferencia más popular que el chocolate bitter o dark (JARRÍN, 2010).

- **Chocolate blanco:** Contiene manteca de cacao como la principal fuente de grasa, es actualmente considerado dentro del grupo de chocolates. Esta constituido sólo de manteca de cacao (20% mínimo), leche en polvo (14%), azúcar (55% máximo), vainilla y lecitina. Sin nada de pasta de cacao, es un chocolate dulce, aunque puede llegar a tener la misma intensidad de sabor que el chocolate bitter o dark (JARRÍN, 2010).

2.2.3. Proceso de elaboración

Según (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012), la formulación para el proceso de elaboración de chocolate bitter o dark de 70% está compuesta por un 65% de pasta de cacao, 5% de manteca de cacao y 30% de azúcar (Figura 2).

- **Mezclado:** Es un proceso fundamental donde se combina el tiempo y temperatura en mezcladores a batch; la pasta de cacao, azúcar, manteca de cacao (y leche en polvo dependiendo del producto) se mezcla normalmente a 40 – 50°C/12 – 15 min (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012).
- **Conchado:** Es un proceso esencial que contribuye al desarrollo de la viscosidad, textura y sabor, se realiza a 45°C – 50°C/26 h (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012). El conchado se realiza agitando el chocolate a más de 50°C por algunas horas, el tiempo de conchado varía de acuerdo al tipo de chocolate que se desee elaborar: Para chocolates con leche va de 10 – 16 h a 49 – 52°C y para chocolates bitter o dark de 16 – 24 h a temperaturas entre 70°C – 82°C (AFOAKWA, 2010).

Hay tres etapas en la operación del conchado cada una de las cuales exige más o menos el mismo tiempo: En la etapa seca, se busca homogenizar la mezcla de los ingredientes, a temperatura constante. Durante la etapa pastosa, es necesario mantener permanentemente la temperatura, para tener un sabor resaltante, para esto es mejor usar una camisa de agua termostática en la concha, capaz de reaccionar espontáneamente a las alteraciones de temperatura. A medida que progresa el conchado mejoran las propiedades de fluidez (etapa fluida), esto se debe a la disminución de agua que se contiene en la concha y al recubrimiento con manteca en las partículas presentes. La reducción final de viscosidad se consigue por medio del agente emulsificante (lecitina), cerca del final del conchado. Está generalmente aceptado que una parte de lecitina comercial puede sustituir 7 ó 10 partes de manteca de cacao (BECKETT, 1994).

- **Temperado o atemperado:** Consta de cuatro pasos claves: Derretimiento a 50°C, enfriamiento al punto de cristalización a 32°C, cristalización a 27°C y conservación de algún cristal inestable a 29 – 31°C. En la antigüedad el chocolate era temperado a mano, y este método es ocasionalmente usado por chocolateros que producen pequeñas cantidades. En el temperado continuo, el chocolate es llevado a 45°C y luego es enfriado lentamente para iniciar la formación de cristales (AFOAKWA, 2010). El temple del chocolate debe llegar a una temperatura de 30°C/10 min (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012).

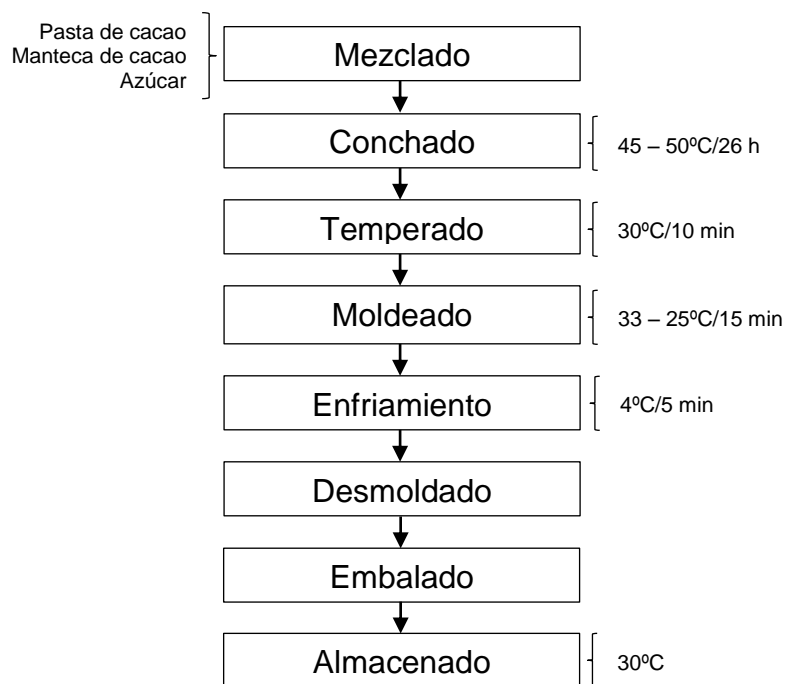


Figura 2. Diagrama de proceso de obtención de chocolate amargo.

- Moldeado:** Se moldea en tabletas que se encuentran a la misma temperatura que la masa para evitar contraste de temperaturas. Luego se someten a una serie de vibraciones, donde son agitados brevemente para eliminar las burbujas de aire que pudieran haberse formado al caer la masa al molde (AFOAKWA, 2010). Si el chocolate atemperado entra en contacto con una superficie caliente, los cristales de chocolate se empiezan a fundir, por lo que no habrá los suficientes para que solidifique adecuadamente. Por otro lado, el contacto con una superficie fría puede originar que parte de la grasa solidifique en una forma incorrecta. Por tal motivo, es importante que los moldes vacíos se precalienten a una temperatura de unos pocos grados por debajo de la del chocolate atemperado antes de empezar el proceso del

moldeado (BECKETT, 1994). Se realiza a una temperatura aproximada de 33 - 25°C/15 min (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012).

- **Enfriamiento:** Entran a un túnel o cámaras de frío a 4°C/5 min (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012). Se enfría uniformemente el chocolate hasta endurecerlo y darle su forma definitiva (AFOAKWA, 2010).
- **Desmoldado:** Cuando la masa se enfría se contrae más que el molde, por lo que sólo con darle vuelta se desprende y se desmolda (AFOAKWA, 2010).
- **Embalado:** Se utiliza papel de aluminio o papel glassine (protegen contra infestaciones y suciedad), se envuelven en el papel que identifica al producto y la empresa y se embalan en cajas de cartón corrugado (HERNANDEZ, 2010).
- **Almacenado:** Se realiza en sitios secos y ventilados a 30°C, las cajas se colocan en arrumes sobre estibas (6 cajas por estiba) (HERNANDEZ, 2010).

2.2.4. Sentidos y degustación del chocolate

Según LA CATALANA (2011), independientemente de su forma o calidad, el sabor constituye, en realidad, la suma de tres percepciones: Gustativas, olfativas y físicas.

- **Percepciones gustativas:** Son fruto de las “papilas gustativas”, unas pequeñas asperezas, esta percepción es la que informa del amargor, la acidez, el dulzor y la astringencia de un chocolate.
- **Percepciones olfativas:** Son transmitidas por unas terminaciones nerviosas situadas en la nariz, aunque los alimentos nunca están en contacto directo

con ellas. Son extremadamente sensibles, y revelan toda la paleta aromática de un gran cacao (cacao, floral y afrutada).

- **Percepciones físicas:** Tienen su origen en toda la boca y se refieren al carácter caliente, frío, picante o astringente de un alimento y a todo lo relativo a su textura: Fundente, granuloso u homogéneo.

Según GARCÍA (2011), degustar el chocolate consiste en experimentar, analizar y apreciar sus características organolépticas, y es una experiencia total, ya que emplea los cinco sentidos: Visual, olfativo, gustativo, táctil y auditivo.

- **La vista:** Es el sentido con el que se establece el primer contacto con el chocolate, por tanto, es esencial y no debe obviarse. Se empieza por valorar el color del producto, luego la saturación de los tonos y por último el brillo, la cual es un indicio de que la pasta de cacao se atemplado, moldeado y enfriado correctamente (LA CATALANA, 2011).
- **El olfato:** Los chocolates tiene un olor, lo cual constituye como un indicador del porcentaje de cacao y de la calidad de su torrefacción (LA CATALANA, 2011).
- **El gusto:** En cuanto al gusto, se debe concentrar en el sabor dulce, en la acidez porque puede ser un indicio de un cacao mal fermentado o mal secado y por último en el amargor porque constituye un indicador acerca del porcentaje de cacao y de su grado de torrefacción (LA CATALANA, 2011).
- **El tacto:** El chocolate también se saborea con los dedos, si es liso, casi impalpable o ligeramente rugoso, lo cual permite juzgar sobre la riqueza en

manteca de cacao de un chocolate, así como la finura de los microorganismos que lo componen (LA CATALANA, 2011).

- **El oído:** También el oído juega un papel en la degustación del chocolate, en el momento en que se parte una tableta, se oye un “crack” seco y breve o, al contrario, el chocolate cede progresivamente sin que se llegue a oírlo. En el primer caso, sin duda, el chocolate está demasiado frío para degustarse en perfectas condiciones, en el segundo, probablemente esté demasiado caliente (LA CATALANA, 2011).

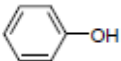
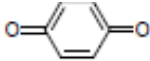
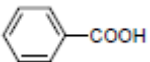
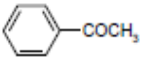
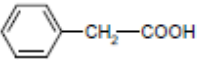
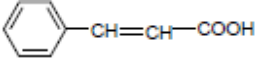
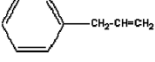
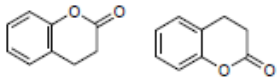
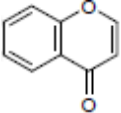
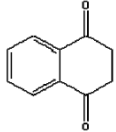
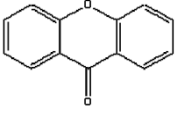
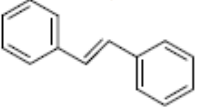
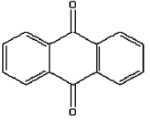
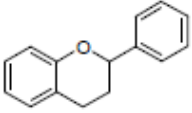
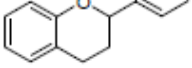
2.3. Generalidades de polifenoles totales

2.3.1. Polifenoles totales

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con más de 8000 compuestos distintos, su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble (MARTÍNEZ *et al.*, 2000), éstos se caracterizan por tener en su estructura química al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos de hidroxilo y frecuentemente se encuentran como derivados de ésteres, éteres y glucósidos (GIL, 2012).

En el Cuadro 5 se ilustra las estructuras básicas de los compuestos polifenólicos más representativos, entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante e incluye a más de 5000 compuestos bien identificados (WOLLGAST, 2004).

Cuadro 5. Principales compuestos polifenólicos.

Clase	Esqueleto básico	Estructura básica
Fenol simple	C ₆	
Benzoquinona	C ₆	
Ácido fenólico	C ₆ - C ₁	
Acetofenona	C ₆ - C ₂	
Ácido fenilacético	C ₆ - C ₂	
Ácido hidroxicinámico	C ₆ - C ₃	
Fenilpropenos	C ₆ - C ₃	
Coumarinas, isocoumarinas	C ₆ - C ₃	
Cromones	C ₆ - C ₃	
Naftoquinonas	C ₆ - C ₄	
Xantonas	C ₆ - C ₁ - C ₆	
Estilbenos	C ₆ - C ₂ - C ₆	
Antraquinonas	C ₆ - C ₂ - C ₆	
Flavonoides	C ₆ - C ₃ - C ₆	
Lignanós, neolignanós	(C ₆ - C ₃) ₂	

Fuente: WOLLGAST (2004).

Todos poseen una estructura de 3 anillos consistentes en 2 centros aromáticos (anillos A y B) y un heterociclo oxigenado central (anillo C) (Figura 3) y están típicamente conjugados a azúcares, clasificándose en 6 subgrupos: Flavonoides, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas y catequinas (GUTIÉRREZ, 2002).

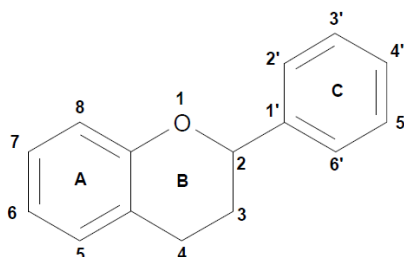


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.

Los flavonoides, especialmente los flavan-3-ols(\pm)-catequina, (-)-epicatequina, galactocatequina y (-)-epigalocatequina, son los constituyentes monoméricos de los taninos condensados, compuestos fácilmente hidrolizables que poseen altos pesos moleculares y que son insolubles en solventes orgánicos acuosos (CADENA y HERRERA, 2008).

2.3.2. Polifenoles en el cacao y chocolate

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes en el cacao, por lo tanto, el chocolate es rico en flavonoides con la estructura de las catequinas y epicatequinas y sobre todo de los polímeros tipo procianidinas que se forman durante el procesamiento del grano de cacao por unión desde 2 a 10 monómeros de epicatequina debido a la acción en esas condiciones de la enzima polifenol oxidasa. Las procianidinas formadas por la unión de 2 a 6

monómeros de epicatequina son las más abundantes, mientras que las que contienen entre 2 a 5 monómeros son las más activas, probablemente debido a que la forma monomérica es metabolizada muy rápidamente y excretada, mientras las poliméricas mayores de 6 unidades pueden tener dificultades para penetrar las membranas celulares y son por tanto pobremente absorbidas (GUTIÉRREZ, 2002).

Los tipos de polifenoles presentes en las semillas de cacao (Cuadro 6), los más comunes son: Flavan-3-ols, catequinas, epicatequinas y procianidinas poliméricas y oligoméricas conformadas por subunidades de (-)-epicatequina (Figura 4) (CADENA y HERRERA, 2008).

Cuadro 6. Contenido polifenólico en semillas de cacao.

Catequinas	Antocianinas	Procianidinas	Flavonol Glicosídico
(-)-epicatequina	Cianidina-3- α -l-arabinosa	Procianidina B1	Quercetina-3-O- α -d-arabinosa
(+)-catequina	Cianidina-3- β -d-galactosa	Procianidina B2	Quercetina-3-O- β -d-glucopiranososa
(+)-galocatequina		Procianidina B3	
		Procianidina B4	
(-)-epigalocatequina		Procianidina B5	
		Procianidina C1	

Fuente: CADENA y HERRERA (2008).

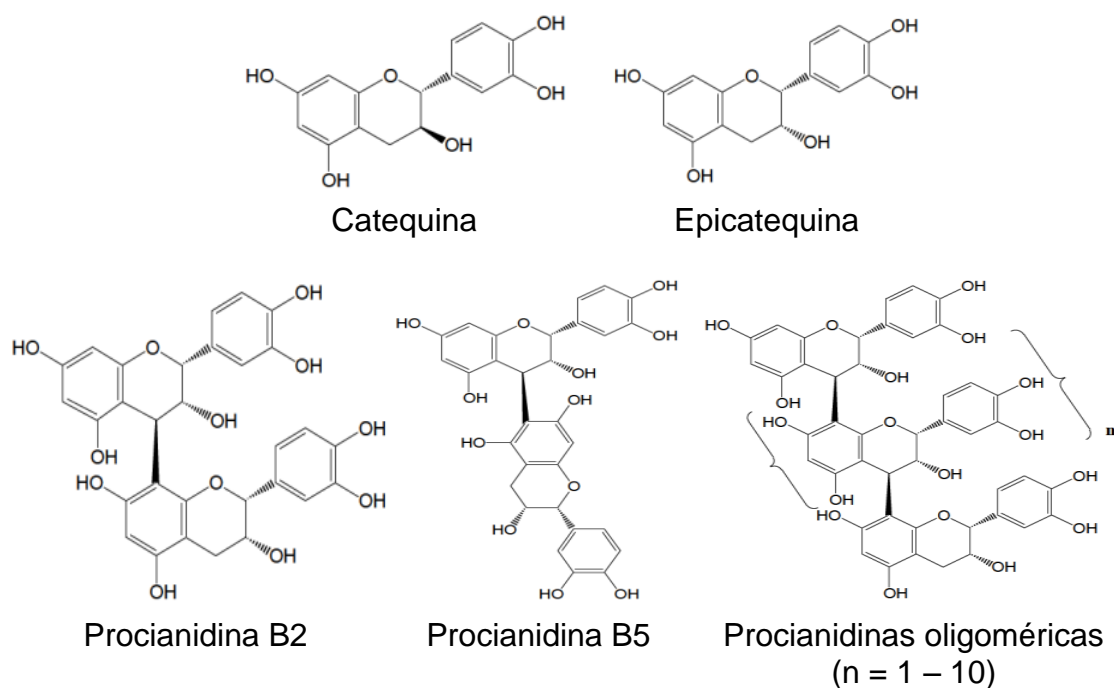


Figura 4. Principales polifenoles que se encuentran en *Theobroma cacao*.

La aparición de trazas de galocatequina y epigalocatequina (Figura 5), dos catequinas antioxidantes que están presentes en cantidades significativas en el té, se ha presentado para el cacao también (WOLLGAST, 2004).

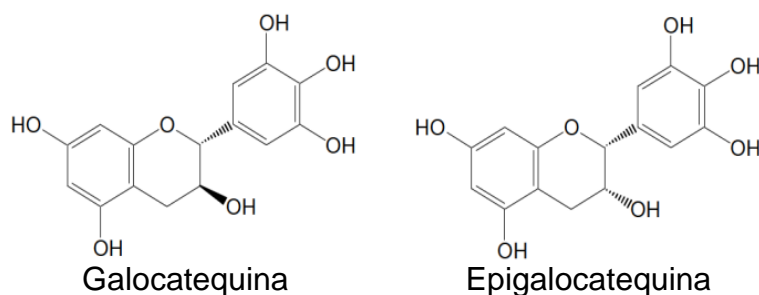


Figura 5. Catequinas que se encuentran en pequeñas cantidades en el cacao.

2.4. Generalidades de antocianinas

2.4.1. Antocianinas

El término antocianina se refiere a los glucósidos de antocianidina, por ejemplo: Mavidina y cianidiana (WOLLGAST, 2004). Son metabolitos secundarios, los cuales forman el color púrpura, roja y azul en tejidos vegetales, y morada a rosa en las semillas de cacao. Son producidos a partir de las leucoantocianidinas o procianidinas (compuestos incoloros) por la acción de la enzima antocianidina sintasa en la ruta de biosíntesis de flavonoides (Figura 6) (MÁRQUEZ, 2009).

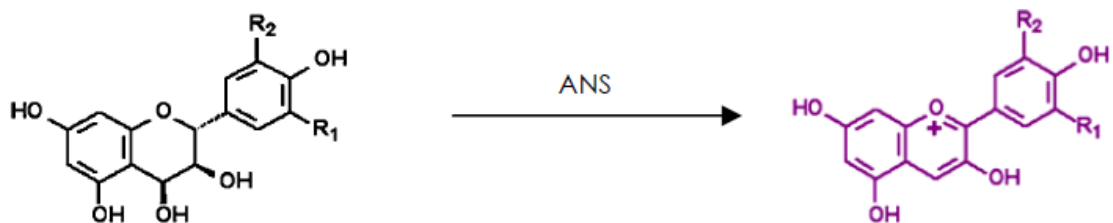


Figura 6. Esquema general de la reacción de transformación de procianidinas a antocianinas.

2.4.2. Antocianinas en el cacao y chocolate

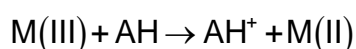
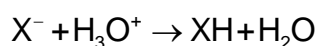
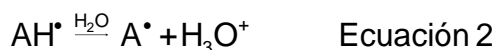
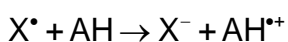
Las antocianinas y antocianidinas están asociadas a la formación de precursores del sabor característico del chocolate, tras formar complejos con proteínas y péptidos, y de la polimerización oxidativa con otros polifenoles durante la fermentación. Se ha establecido la relación entre la constitución de polifenoles presentes en los cotiledones y el desarrollo del sabor a chocolate, a mayor concentración de antocianinas, más amargo es el producto y mayor es el tiempo de fermentación de los granos de cacao (MÁRQUEZ, 2009).

La cantidad de polifenoles solubles encontrados en las semillas secas y libres de grasa oscila entre 15 a 20% y están constituidos por un 37% de catequinas, un 4% de antocianinas y un 58% de proantocianidinas. La (-)-epicatequina es la catequina que se encuentra con mayor proporción conformando el 35% de total de polifenoles (CADENA y HERRERA, 2008).

2.5. Generalidades de capacidad antioxidante

La determinación cuantitativa de los polifenoles totales en cacao y sus productos incluyen su medición por el método de folin ciocalteu o la cuantificación por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) de (-)-epicatequina y (+)-catequina.

La determinación de la actividad antioxidante se basa en ensayos con dos tipos de mecanismos de reacción: El primero **HAT**, ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (ecuación 1); y el segundo **SET**, ensayos basados en reacciones de transferencia de un solo electrón que posee el potencial para reducir algún compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales (Ecuación 2).



Los ensayos tipo SET involucran reacciones redox con el oxidante mientras que los ensayos con reacciones tipo HAT, monitorean la cinética de la reacción. Los métodos tipo HAT, generalmente emplean sustancias generadoras de radicales libres, una molécula oxidable de prueba y un antioxidante, estas reacciones son rápidas y dependientes del pH, mientras que las reacciones de transferencia de electrones son lentas; por esta razón las mediciones tipo SET se basan más en el decrecimiento de un producto que en su cinética.

Existen métodos en los cuales se aplican los dos tipos de mecanismos como el DPPH y el ABTS⁰⁺ (CADENA y HERRERA, 2008).

2.5.1. Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

El radical DPPH es uno de los pocos radicales orgánicos estables del nitrógeno (Figura 7) y está relacionado con las reacciones de peroxidación lipídica. Este ensayo se basa en la medida de la habilidad reductora de los antioxidantes sobre el radical DPPH, habilidad que se evalúa por la medida del decrecimiento de su absorbancia medida a 515 nm, después de reaccionar con los compuestos ensayados (CADENA y HERRERA, 2008).

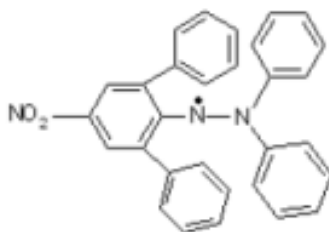


Figura 7. Estructura del radical DPPH.

Aunque se cree que la reacción en el ensayo de DPPH ocurre por un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno, en su investigación FOTI *et al.* (2004) reportaron que la reacción ocurre por un mecanismo tipo SET, ya que el paso determinante de la velocidad de reacción es un proceso rápido de transferencia de electrones del anión peróxido al DPPH, mientras que la abstracción del átomo de hidrógeno del ArOH neutral por parte del DPPH sería una ruta secundaria muy lenta.

Aunque el ensayo de DPPH es técnicamente simple y ampliamente usado, la alta estabilidad del reactivo comparada con la de los radicales peróxido involucrados en las reacciones de peroxidación lipídica dificulta la medición (HUANG *et al.*, 2005).

El efecto de eliminación que tienen las sustancias antioxidantes sobre el radical DPPH suele calcularse midiendo el nivel de atrapamiento del radical por parte del antioxidante que se expresa como porcentaje de DPPH remanente (%) después de transcurrido la reacción y como concentración efectiva media IC_{50} (CADENA y HERRERA, 2008).

2.5.2. Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS⁰⁺)

El ensayo ABTS⁰⁺ o TEAC fue reportado por primera vez por Miller y Rices en 1995, quienes se basaron en la capacidad de “barrido” de los antioxidantes sobre el anión radical ABTS⁰⁺ (Figura 8). En este ensayo el ABTS es oxidado por los radicales peróxidos u otros oxidantes generando el radical ABTS⁰⁺, el cual posee un color verde intenso (CADENA y HERRERA, 2008).

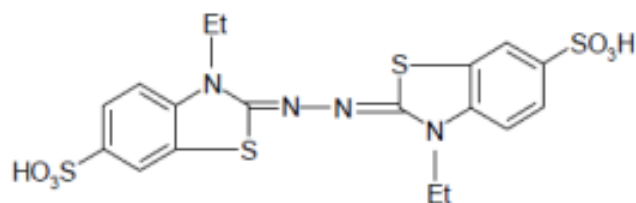


Figura 8. Estructura del ABTS⁰⁺.

El radical ABTS⁰⁺ es el más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las antocianinas, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734 nm) reduciendo así posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que se absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacciones secundarias (KUSKOSKI *et al.*, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Nutrición Animal, Carnes y el Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico de la Amazonía (CIDBAM), de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región de Huánuco; a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09°17'08" de latitud Sur, a 75°59'52" de latitud Oeste, con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84% y temperatura anual de 24°C. En la Empresa Agroindustrias Makao Perú S.A.C., ubicada en el Jr. Cuzco 402 del distrito de Pucacaca, provincia de Picota, región de San Martín, ubicada a 58 Km de la ciudad de Tarapoto.

3.2. Materia prima

- **Base bitter de 60%:** Se obtuvo de la Empresa Agroindustrias Makao Perú S.A.C.
- **Cacao porcelana:** Las mazorcas se obtuvieron de la "Asociación de pequeños productores de cacao de Piura – APPROCAP" ubicado en la calle José Carlos Mariátegui S/N (coliseo municipal del distrito), distrito de San

Juan de Bigote, provincia de Morropon, región de Piura, el cual fue brindado por el Ing. Normando Salvador García.

- **Cacao CCN-51 y criollo:** Las mazorcas se obtuvieron del Fundo “Alborada” que se encuentra a la entrada al Caserío Papayal, Castillo Grande, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región de Huánuco, el cual fue brindado y certificado por el propietario y especialista el Ing. Mendis Paredes Arce.

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

3.3.1. Materiales de laboratorio y/o proceso

Matraces de Erlenmeyer de 250 mL; vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 1000 mL; pipetas graduadas de 5 y 10 mL; tubos de ensayo 10 mL; fioles de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 mL; probetas graduadas de 10, 100, 250 y 500 mL; frascos ámbar de 100 mL; embudo; micropipetas 0 – 10, 10 – 100, 20 – 200 y 100 – 1000 μ L; cubetas de poliestireno (1 cm x 1 cm x 4,5 cm); tips, (1000 y 200 μ L); microtubos (1,5 – 2 mL); papel filtro; gradillas; espátulas; moldes; recipientes y papel aluminio.

3.3.2. Equipos de laboratorio y/o proceso

Espectrofotómetro modelo Genesys 6 (Thermo Electrón Corporation) SN 2M6G261002; Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión), capacidad 200g y modelo Adventurer Pro AV114 (OHAUS) capacidad 110 g; Estufa modelo ODH6-9240A (TOMOS Heating Drying

Oven); Congelador FFV-2065FW -20°C (Frigidaire, USA); Refrigerador IcebeamDoorCooling LG modelo GR-5392QLC (Corea); Desionizador modelo D 7035 (Barnstead); Agitador magnético modelo 625 standard (VWRTM hotplate/stirrer); Homogenizador modelo VORTEX GENIE-2 (Scientific industrias. SITM); Centrifuga modelo MIKRO 22R (Hettich); pH-metro (Mettler Toledo Seven Easy) pH 0 – 14, Termómetro digital infrarrojo con puntero laser tipo pistola -32 a 380°C; Soxhlet aparato de extracción con serie de 6 plazas con frascos de 250 mL 230 VAC 50 – 60 Hz y mesa vibradora.

3.3.3. Reactivos y solventes

Ácido clorhídrico (HCl) (Merk) pureza 36,5 %; cloruro de potasio (KCl) pureza 99,5 %; acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) pureza 99 %; ácido gálico (C₇H₆O₅) al 98,1% Sigma; folin-ciocalteu phenolre agent (2N, Sigma Aldrich); carbonato de Sodio (Na₂CO₃); etanol al 96% de pureza; 1,1-Diphenyl-1-picril-hydrayl (DPPH, Sigma Aldrich, USA); 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) diammoniums salt (ABTS); agua destilada desionizada (H₂O_{dd}); persulfato de potasio (K₂S₂O₈) p.a. Sigma Chemical y hexano.

3.4. Métodos de análisis

Cuantificación de polifenoles totales: Se realizó por el método espectrofotómetro desarrollado por FOLIN CIOCALTEU *et al.* (1927) reportado por SANDOVAL *et al.* (2002).

Cuantificación de antocianina: Se realizó por el método del pH diferencial reportado por ZAPATA *et al.* (2014).

Determinación de la capacidad antioxidante:

- **Capacidad de inhibir radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH):** Se realizó por el método espectrofotómetro UV/Visible a 517 nm descrito por BRAND *et al.* (1995).
- **Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS⁰⁺):** Se realizó por el método descrito por RE *et al.* (1999).

Análisis sensorial: Se realizó por el método de COCHRAN y COX (1995), BACELAR *et al.* (2013) y FRANCO e HIDALGO (2003).

3.5. Metodología experimental**3.5.1. Obtención de los nibs fermentados y no fermentados****3.5.1.1. Nibs fermentados**

En la Figura 9 se presenta el diagrama de proceso de la preparación de los nibs fermentados, la cual se describe a continuación:

- **Cosecha:** Los frutos fueron cosechados teniendo en cuenta su índice de madurez, evitando la cosecha de frutos pintones, enfermos y sobremaduros, disponibles por cada una de las variedades, posteriormente están fueron transportadas hasta el laboratorio.
- **Quiebre y desgrane:** Se realizó el quiebre de las mazorcas, para ello se utilizó un machete sin filo inverso; seguidamente las semillas fueron colocadas en un envase sin placenta.
- **Micro-fermentación:** Según NAZARIO (2014) consistió en colocar aproximadamente 1 Kg de granos de cacao en un envase de plástico con

orificios en la parte posterior para facilitar el exudado, la temperatura de la estufa fue $33^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

- **Primera remoción:** Transcurrido las 48 h del proceso de fermentación se procedió a realizar la primera remoción de la masa de forma rápida para evitar la pérdida de calor, posteriormente se incrementó la temperatura de la estufa a $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- **Segunda remoción:** Se realizó transcurrido las 72 h, la remoción se realizó de forma inmediata con la finalidad de evitar la pérdida de calor en la masa.
- **Tercera remoción:** Esta remoción se realizó a las 96 h y posteriormente se incrementó la temperatura en la estufa a $45^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- **Cuarta remoción:** La remoción se realizó a las 120 h, y se incrementó la temperatura a $47^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, con la finalidad de generar calor en la masa.
- **Prueba de fermentación:** Se realizó a las 144 h, para esta prueba se seleccionaron 10 granos de cacao al azar, se cortó con un cuchillo por la mitad para comprobar si la fermentación fue completa o no, se calificó como buena fermentación ≥ 7 granos de cacao.
- **Secado:** Los granos se secaron hasta obtener una humedad de 7,5%, según la Norma Peruana NTP-ISO 2291 (2006). Para ello los granos fueron colocados sobre una madera debidamente codificada y la remoción de los granos fueron cada 2 h.
- **Tostado:** Los granos fueron tostados en una estufa a $115^{\circ}\text{C}/30 - 45$ min.
- **Descascarillado:** Se realizó de forma manual con la ayuda de un mortero.

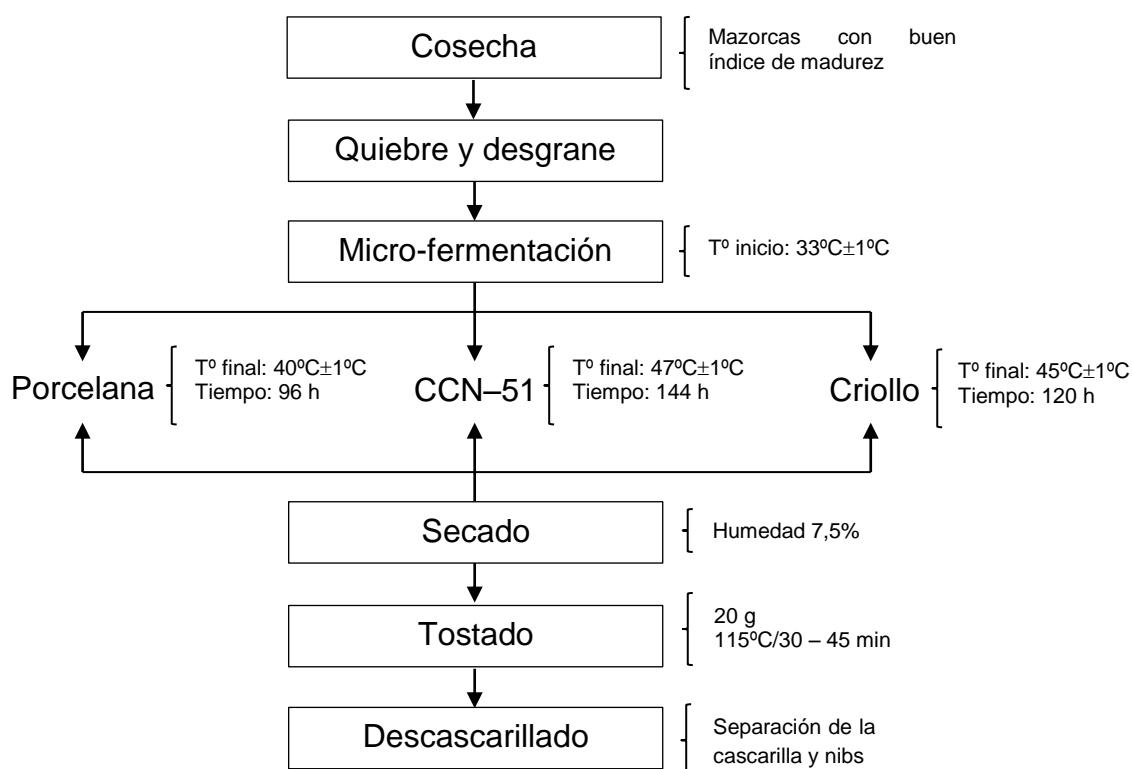


Figura 9. Diagrama del proceso para obtención de nibs de cacao fermentados.

3.5.1.2. Nibs no fermentados

En la Figura 10 se presenta el diagrama de proceso de la preparación de los nibs no fermentados, la cual se describe a continuación:

- **Cosecha:** Los frutos fueron cosechados teniendo en cuenta su índice de madurez, evitando la cosecha de frutos pintones, enfermos y sobremaduros, disponibles por cada una de las variedades, posteriormente están fueron transportadas hasta el laboratorio.
- **Quiebre y desgrane:** Se realizó el quiebre de las mazorcas, para ello se utilizó un machete sin filo inverso y seguidamente las semillas fueron separadas de la placenta.

- **Secado:** Los granos se secaron hasta obtener una humedad de 7,5%, según la Norma Peruana NTP-ISO 2291 (2006). Para ello los granos fueron colocados sobre una madera debidamente codificada y la remoción de los granos fueron cada 2 h.
- **Tostado:** Los granos fueron tostados en una estufa a 115°C/30 – 45 min.
- **Descascarillado:** Se realizó de forma manual con la ayuda de un mortero.

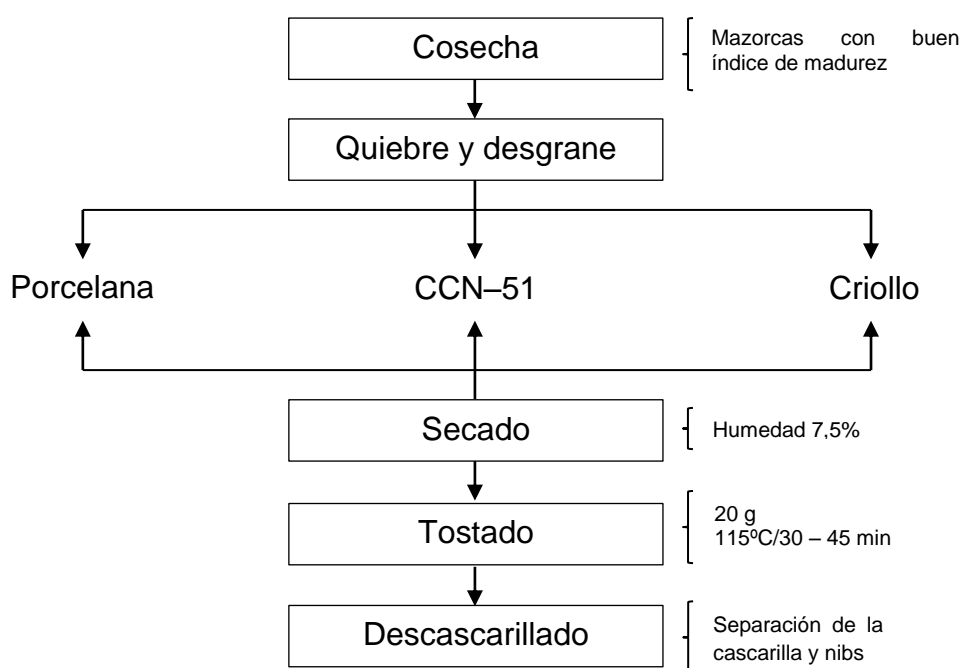


Figura 10. Diagrama del proceso para obtención de nibs de cacao no fermentados.

3.5.2. Distribución de los tratamientos

Los chocolates bitter de 60% fueron elaborados con dos tipos de inclusiones de nibs: Fermentados y no fermentados, tal como se indica a continuación:

T1 = Chocolate bitter sin nibs (testigo).

T2 = Chocolate bitter con nibs de porcelana fermentado.

T3 = Chocolate bitter con nibs de CCN-51 fermentado.

T4 = Chocolate bitter con nibs criollo fermentado.

T5 = Chocolate bitter con nibs de porcelana no fermentado.

T6 = Chocolate bitter con nibs de CCN-51 no fermentado.

T7 = Chocolate bitter con nibs criollo no fermentado.

3.5.3. Elaboración de chocolate bitter con nibs de tres variedades fermentados y no fermentados

En la Figura 11 se presenta el diagrama de la elaboración de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados, la cual se describe a continuación:

- **Base bitter de 60%:** La formulación fue 55% de pasta de cacao; 5% de manteca de cacao; 39,5% de azúcar blanca fina y 0,5% de lecitina, fue conchado a 50°C/18 h para obtener una finura de 13 µm.
- **Calentamiento:** Mediante un sistema de baño maría, se calentó la base de bitter en un recipiente de acero inoxidable, hasta que se torne fluida y llegue a 50 – 52°C.
- **Mezclado:** La base de bitter se colocó sobre la mesa de acero inoxidable y se adicionó 7% de los nibs fermentados y no fermentados (porcelana, CCN-51 y criollo) para cada tratamiento.
- **Atemperado:** Con ayuda de espátulas de acero inoxidable se realizó el atemperado manualmente, mediante esta operación la temperatura del bitter de 50 – 52°C descendió a 30 – 31°C.

- **Moldeado y vibrado:** Se colocó la mezcla en los moldes debidamente codificada y se llevó a la mesa vibratoria para eliminar las burbujas de aire que se pudieron formar en el interior del chocolate, de este modo evitar rupturas al momento de desmoldar.

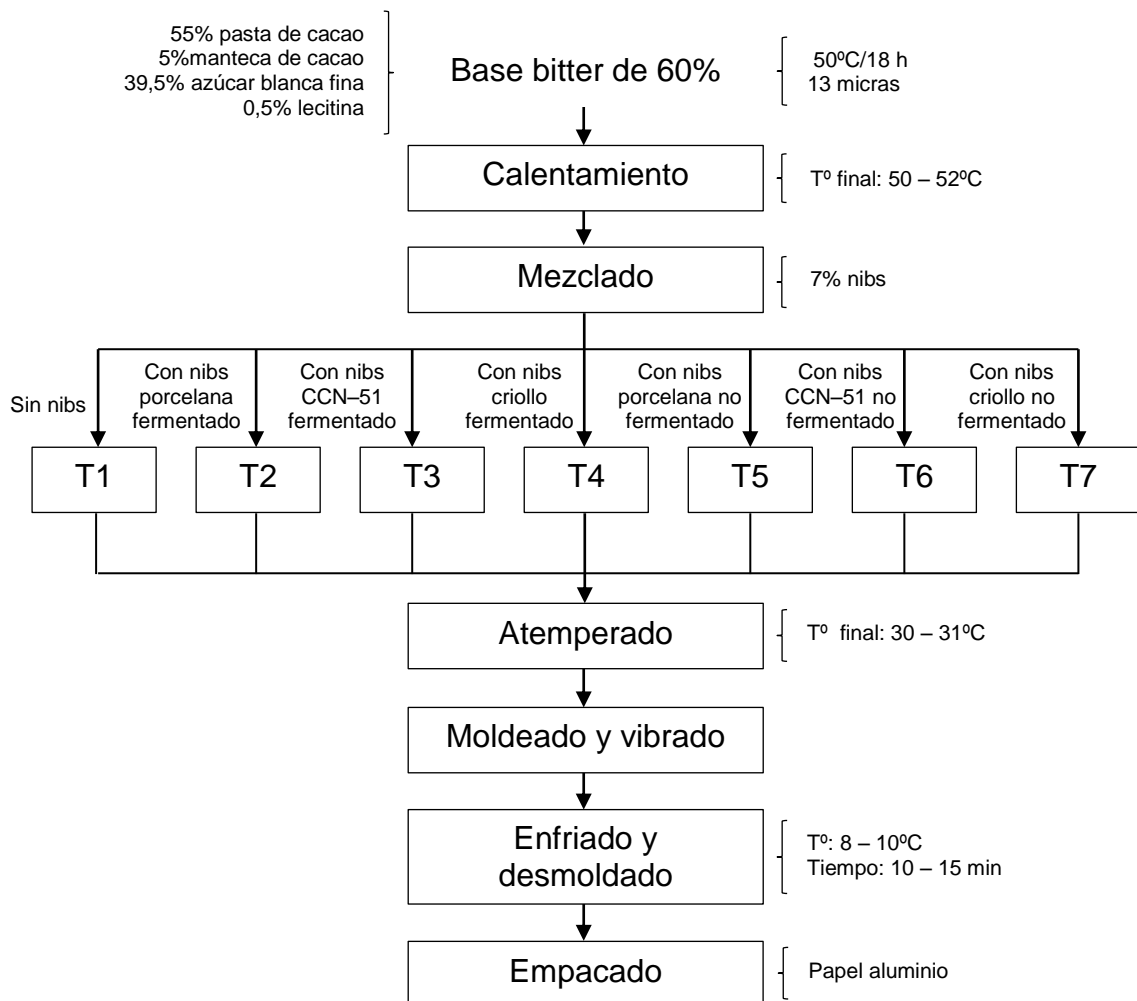


Figura 11. Diagrama de elaboración de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

- **Enfriado y desmoldado:** Seguidamente se colocaron los moldes en la cámara frigorífica a 8 – 10°C/10 – 15 min o hasta que la parte inferior del molde se torne blanquecina y luego se desmoldaron.

- **Empacado:** Se dejó reposar los chocolates en un ambiente a 17°C/5 min y posteriormente se empacó con papel aluminio.

3.5.4. Preparación del extracto hidroalcohólico

Las operaciones realizadas para la preparación de los extractos hidroalcohólicos se muestran en la Figura 12 y se describe a continuación:

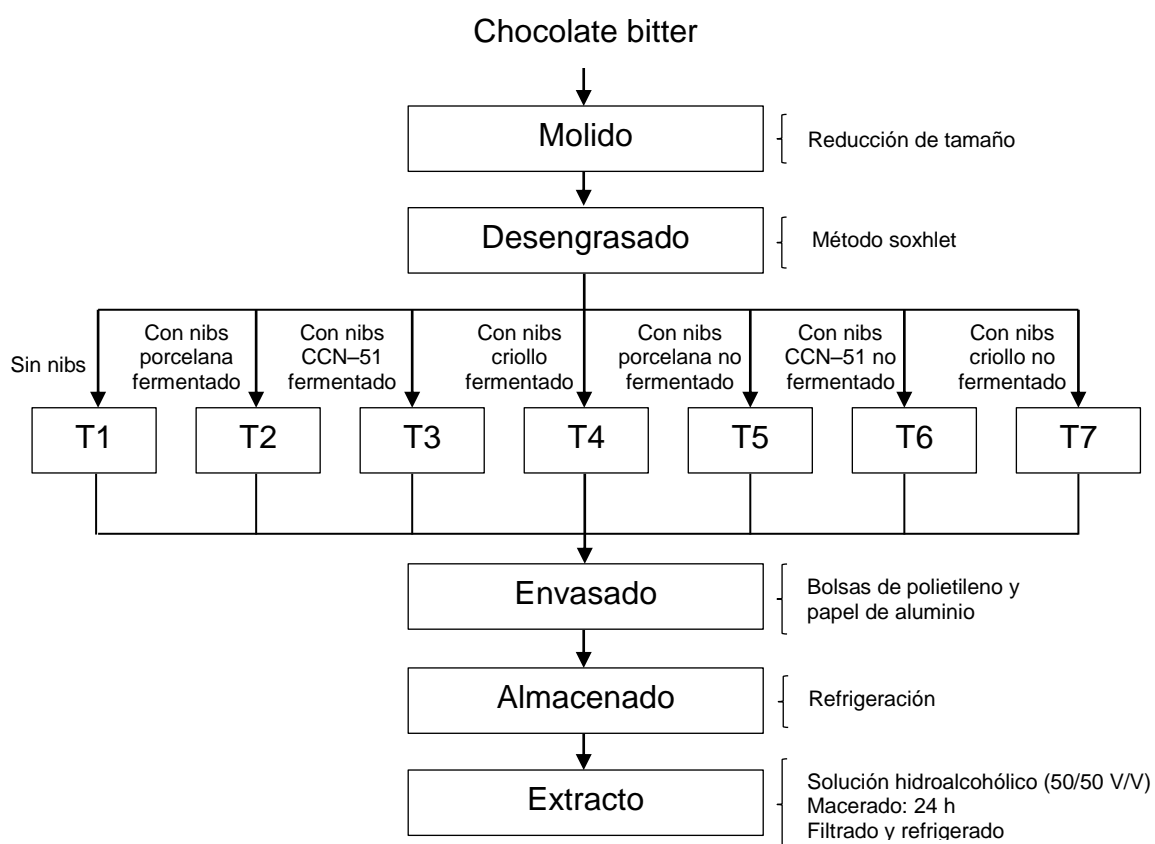


Figura 12. Diagrama de flujo para la preparación del extracto hidroalcohólico del chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

- **Molido:** Los chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados fueron picados con un cuchillo de acero inoxidable para reducir su tamaño.

- **Desengrasado:** El desengrasado se realizó por el método de soxhlet (NÚÑEZ, 2008), que consistió en pesar 10 g de muestra (molida) la cual se envolvió un papel filtro y se colocó dentro del tubo de extracción, se adicionó el solvente (hexano) dentro del matraz de extracción luego fue colocado en el sistema soxhlet, se dejó extraer la grasa de la muestra con el solvente por 5 a 6 h, una vez terminada la extracción se retiró la muestra y se secó en una estufa a 45°C/15 min para evaporar el solvente.
- **Envasado:** Las muestras desengrasadas fueron envasados en bolsas de polietileno, selladas, rotuladas y forrados con papel aluminio.
- **Almacenado:** Las bolsas de polietileno conteniendo las muestras de chocolate molido y desengrasado fueron almacenados en refrigeración hasta su análisis.
- **Extracto:** Se pesó 3 g de muestra desengrasada, el cual se transfirió a un frasco de vidrio color ámbar y se adicionó 30 mL de solución hidroalcohólico (50 mL H₂O desionizada/50 mL etanol V/V), luego fue tapado herméticamente, se maceró por 24 h en el agitador, finalmente se filtró y se almacenó en refrigeración en frascos color ámbar hasta su posterior análisis.

3.5.5. Cuantificación de polifenoles totales en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados

3.5.5.1. Determinación de la curva estándar

Se realizó de acuerdo como se menciona en el A-I.

3.5.5.2. Cuantificación de polifenoles totales

El procedimiento para la cuantificación de polifenoles totales en las muestras de chocolate bitter, se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (filtrado y centrifugado 10000 rpm/10 min a 4°C) a partir de ello se realizó la dilución de trabajo a 10 mg/mL de la cual se tomaron tres repeticiones por tratamiento, luego la reacción se realizó adicionando en los tubos de ensayos para cada tratamiento 1580 µL de agua desionizada, 20 µL de extracto diluido (10 mg/mL), 100 µL de fenol folin ciocalteu y finalmente 300 µL de Na₂CO₃ al 20% y se incubo por 2 h a temperatura ambiente y oscuridad, luego se hizo lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 700 nm. Las absorbancias obtenidas fueron reemplazadas en la ecuación de la curva estándar y expresadas en equivalente de ácido gálico (g EAG/100 g).

- **Análisis estadístico:** Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) (MENDIBURU, 2005), 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 versión 0,9 (español).

3.5.6. Cuantificación de antocianinas en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados

La concentración de antocianinas monoméricas se determinó por el método de pH-diferencial (ZAPATA *et al.*, 2014). Para ello se preparó dos buffer la cual de describe a continuación:

Buffer pH = 1: Se pesó 1,86 g de cloruro de potasio (KCl) y se adiciono 980 mL de agua desionizada y se ajustó con ácido clorhídrico (HCl).

Buffer pH = 4,5: Se pesó 54,43 g de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) y se adicionó 970 mL de agua desionizada y se ajustó con ácido clorhídrico (HCl).

Para la cuantificación de antocianinas se realizó partiendo del extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (filtrado y centrifugado 10000 rpm/10 min a 4°C), se trabajó con tres repeticiones por tratamiento, en una cubeta de poliestireno se adicionó 200 μ L de extracto hidroalcohólico de las muestras de chocolate y se adicionó 800 μ L del buffer para ambos pH (1 y 4,5). La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (510 nm) es proporcional al contenido de antocianinas (ZAPATA *et al.*, 2014). Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se midió la absorbancia a 700 nm. Las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro UV/VIS, contra un blanco de agua desionizada. La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/L de extracto de acuerdo a la expresión siguiente:

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$AT \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(\Delta A)(PM)(FD)(1000)}{(\varepsilon)(l)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: AT es antocianinas totales, ΔA es el cambio de absorbancia, PM es la masa molecular para cianidina-3-glucósido (44932), FD es el factor de dilución, ε es el coeficiente de extinción molar para cianidina-3-

glicosido (26900), l es la longitud de paso de celda (1) y 1000 es el factor de conversión de gramos a miligramos.

- **Análisis estadístico:** Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) (MENDIBURU, 2005), 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 versión 0,9 (español).

3.5.7. Determinación de la capacidad antioxidante en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados

3.5.7.1. Capacidad de inhibir radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

El procedimiento para la evaluación de la capacidad antioxidante para inhibir el radical DPPH, primeramente se preparó una solución stock de DPPH a 1mM (0,0394 g de DPPH en 100 mL de etanol al 96%) y se almacenó a 4°C protegido de la luz. A partir de este stock se preparó 50 mL a 100 μ M en etanol al 96%, que sirvió para hacer reaccionar con las muestras. Para la inhibición del radical DPPH en las distintas muestras de chocolate con nibs fermentados y no fermentados del extracto hidroalcohólico de 100 mg/mL (previamente filtrado, centrifugado y diluido), se prepararon soluciones de trabajo para cada tratamiento tal como se muestra en el Cuadro 7 y Cuadro 8. En una cubeta de poliestireno se agregó 25 μ L de muestra y 975 μ L de solución de DPPH a 100 μ M, la inhibición de los radicales libres se determinó por la degradación del color violeta a amarillo, la lectura se realizó en el

espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm cada 30 s/ 8 min; la capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

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

Dónde: Abs. control es la absorbancia del control y Abs. muestra es la absorbancia de la muestra en 8 min.

A partir del porcentaje de inhibición se calculó IC_{50} (mg/mL) para ello se grafican los valores del porcentaje de inhibición en función a la concentración para cada extracto obteniendo así la ecuación de la gráfica, de la cual se obtendrá la concentración media efectiva (IC_{50}).

- **Análisis estadístico:** Los resultados de la capacidad de inhibir (IC_{50}) del radical DPPH fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) (MENDIBURU, 2005), 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 versión 0,9 (español). Se utilizó la Correlación de Pearson (valor R^2) para determinar la correlación entre la capacidad antioxidante ($1/IC_{50}$) y el contenido de polifenoles (ABBE y ISMAIL, 2010).

Cuadro 7. Concentraciones utilizadas para el análisis de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH.

Muestras	Tratamiento	Concentraciones (mg/mL)					
Sin nibs	T1	0,1	0,15	0,2	0,3	0,325	0,375
Con nibs porcelana fermentado	T2	0,1	0,15	0,175	0,225	0,3	0,375
Con nibs CCN-51 fermentado	T3	0,1	0,125	0,175	0,2	0,275	0,35
Con nibs criollo fermentado	T4	0,075	0,125	0,175	0,225	0,3	0,4
Con nibs porcelana no fermentado	T5	0,1	0,125	0,15	0,175	0,25	0,325
Con nibs CCN-51 no fermentado	T6	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175	0,25
Con nibs criollo no fermentado	T7	0,075	0,1	0,125	0,15	0,225	0,325

Cuadro 8. Preparación de soluciones de trabajo.

Solución de trabajo (mg/mL)	Extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (μL)	Solución hidroalcohólico (μL)	Volumen final (μL)
0,075	30	970	1000
0,1	40	960	1000
0,125	50	950	1000
0,15	60	940	1000
0,175	70	930	1000
0,2	80	920	1000
0,225	90	910	1000
0,25	100	900	1000
0,275	110	890	1000
0,3	120	880	1000
0,325	130	870	1000
0,35	140	860	1000
0,375	150	850	1000
0,4	160	840	1000

3.5.7.2. Capacidad de inhibir radical libre 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS⁰⁺)

Según la metodología el radical ABTS⁰⁺ se forma después de la reacción de ABTS (7 mM) con el persulfato potásico (concentración final 140 mM) el cual se incubo a temperatura ambiente en oscuridad durante 16 h; una

vez formado el radical $ABTS^{0+}$, se diluyó con etanol al 96% hasta obtener un valor de absorbancia entre 0,7 a 1,2. Para la inhibición del radical $ABTS^{0+}$ en las distintas muestras de chocolate con nibs fermentados y no fermentados del extracto hidroalcohólico de 100 mg/mL (previamente filtrado, centrifugado y diluido), se prepararon soluciones de trabajo para cada tratamiento tal como se muestra en el Cuadro 9 y Cuadro 10. En una cubeta de poliestireno se agregó 10 μ L de muestra y 990 μ L de solución de $ABTS^{0+}$, la inhibición de los radicales libres se determinó por la degradación del color verde, la lectura se realizó en el espectrofotómetro UV/VIS a 734 nm cada 30 s/ 5 min; la capacidad de secuestro fue determinado por la siguiente expresión:

$$\% \text{Inhibición } ABTS^{0+} = \left[\frac{(\text{Abs. control} - \text{Abs. muestra})}{\text{Abs. control}} \right] \times 100$$

Dónde: Abs. control es la absorbancia del control y Abs. muestra es la absorbancia de la muestra en 5 min.

A partir del porcentaje de inhibición se calculó IC_{50} (mg/mL) para ello se grafican los valores del porcentaje de inhibición en función a la concentración para cada extracto obteniendo así la ecuación de la gráfica, de la cual se obtendrá la concentración media efectiva (IC_{50}).

- **Análisis estadístico:** Los resultados de la capacidad de inhibir (IC_{50}) del radical $ABTS^{0+}$ fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) (MENDIBURU, 2005), 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 versión 0,9 (español).

Cuadro 9. Concentraciones utilizadas para el análisis de la capacidad antioxidante frente al radical ABTS⁰⁺.

Muestras	Tratamiento	Concentraciones (mg/mL)					
Sin nibs	T1	0,09	0,08	0,05	0,03	0,02	0,01
Con nibs porcelana fermentado	T2	0,09	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02
Con nibs CCN-51 fermentado	T3	0,09	0,07	0,05	0,03	0,02	0,01
Con nibs criollo fermentado	T4	0,08	0,07	0,06	0,04	0,02	0,01
Con nibs porcelana no fermentado	T5	0,07	0,06	0,05	0,04	0,02	0,01
Con nibs CCN-51 no fermentado	T6	0,07	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01
Con nibs criollo no fermentado	T7	0,08	0,07	0,06	0,04	0,02	0,01

Cuadro 10. Preparación de soluciones de trabajo.

Solución de trabajo (mg/mL)	Extracto hidroalcohólico 100 mg/mL (μL)	Solución hidroalcohólico (μL)	Volumen final (μL)
0,01	10	990	1000
0,02	20	980	1000
0,03	30	970	1000
0,04	40	960	1000
0,05	50	950	1000
0,06	60	940	1000
0,07	70	930	1000
0,08	80	920	1000
0,09	90	910	1000

3.5.8. Evaluación sensorial de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados

Se evaluaron siete muestras de chocolates (bitter de 60%), las muestras contenían nibs fermentados y no fermentados obtenidos de tres variedades de cacao: Porcelana, CCN-51 y criollo. Para la evaluación sensorial se utilizó una ficha (A-II) basado según su investigación de BACELAR *et al.* (2013), en la que se incluyó los atributos de color, brillo, aroma y sabor chocolate/cacao, aroma y sabor frutal, aroma y sabor floral, amargor, acidez, astringencia, ductibilidad y granulosis; los calificativos fueron en base a una escala de likert de 4 puntos (1 = ninguna y 4 = intenso). Las evaluaciones se

realizaron generalmente por la mañana, los tratamientos fueron codificados con tres dígitos y se sirvieron en platos descartables (2,5 g de muestra) incluyendo un vaso de agua para limpiar el paladar entre cada muestra.

- **Análisis estadístico:** Para el desarrollo de la prueba se utilizó el Diseño Bloque Incompleto Balaneado (tipo II) (A-III) descrito por COCHRAN y COX (1995) la misma que considera los parámetros siguientes: Tratamientos ($t = 7$), número de muestras que aparecen en cada bloque ($k = 2$), número de repeticiones o jueces por tratamiento ($r = 6$), número de bloques o jueces ($b = 21$), número de veces que un par de muestras aparecen en el mismo bloque ($\lambda = 1$) y error ($E = 0,58$).

Con los resultados se procedió al cálculo de los promedios de cada atributo evaluado con la finalidad de desarrollar el análisis descriptivo cuantitativo (QDA), también se realizó la evaluación del ANOVA, un análisis multivarado, un análisis de componentes principales (ACP), con el fin de describir la variación principal en los datos sensoriales y para obtener los perfiles descriptivos (BACELAR *et al.*, 2013) y graficar su respuesta en un Cluster (dendrograma) y un análisis de conglomerados (FRANCO e HIDALGO, 2003), el cálculo se realizó en el programa de INFOSTAT versión libre.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Evaluación de polifenoles totales en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados

4.1.1. Determinación de la curva estándar

Para la cuantificación de polifenoles totales en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados, fue necesario establecer una curva patrón y se elaboró en base al ácido gálico; las diluciones estuvieron comprendidas entre 0,8 a 0,01 mg/mL (A-IV), los resultados se presentan en la Figura 13.

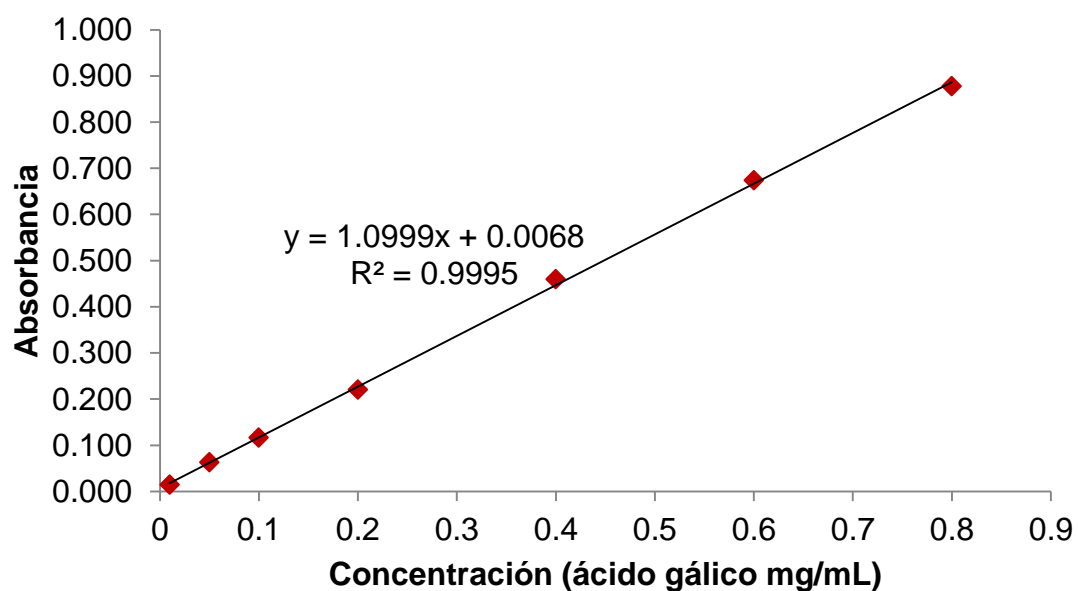


Figura 13. Comportamiento de la curva estándar de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

Para la curva estándar se utilizó ácido gálico químicamente puro y recomendados por el protocolo de análisis, AQUINO *et al.* (1989) indica que el método de folin ciocalteu permite medir fenoles totales y para la cuantificación debe crearse la curva de calibración y puede realizarse con ácido gálico (EGA), porque este es un compuesto estable y se pierde solo 5% de su valor real después de dos semanas de refrigeración y tapado. Realizando la regresión entre la absorbancia y la concentración de ácido gálico se encontró un $R^2 = 0,9995$, la ecuación encontrada es de primer orden teniendo como variables “y” (absorbancia) y “x” (concentración mg/mL), esta alta correlación encontrada permite afirmar que la curva tuvo buen ajuste al modelo matemático, al respecto HERNÁNDEZ *et al.* (2006) menciona que el valor de $R^2 = 0,9918$ indica que existe una relación positiva muy fuerte casi perfecta.

4.1.2. Cuantificación de los polifenoles totales en los chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados

En el Cuadro 11 y Figura 14 se presenta los resultados del contenido de polifenoles totales en los chocolates bitter, según el análisis estadístico (A-V) se encontró diferencia altamente significativa, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) podemos apreciar que la mayor cantidad de polifenoles totales se encontraron en los tratamientos T6 (con nibs CCN-51 no fermentado) $2,923 \pm 0,017$ y T5 (con nibs porcelana no fermentado) $2,738 \pm 0,046$ g EAG/100 g, cabe resaltar seguido a estos tratamientos se encontró al T7 (con nibs criollo no fermentado) $2,654 \pm 0,074$ g EAG/100 g, todos estos tratamientos tuvieron inclusión de nibs no fermentados;

según OTHMAN *et al.* (2007) el contenido de polifenoles en los granos de cacao no fermentado es alto entre 12 a 18% (peso seco), además el 60% del total de los polifenoles en granos frescos de cacao son isómeros de flavonoles (epicatequina y catequina) y oligómeros de procyanidinas. GONZÁLES *et al.* (2012) demostró que los granos del cacao son ricos en antioxidantes específicos, con estructura básica de las catequinas y epicatequinas.

De los resultados de polifenoles con nibs sin fermentar el mayor contenido se encontró en los chocolates bitter que tuvieron nibs CCN-51, seguido del porcelana y el criollo, este comportamiento de los polifenoles puede aducirse que se debe a lo indicado por HUANCA (2010) que en granos no fermentados el criollo tuvo $7,951 \pm 0,037$ y CCN-51 $9,209 \pm 0,034$ g EAG/100 g. El mayor contenido de polifenoles fue para grano sin fermentar criollo $8,012 \pm 0,004$ y CCN-51 $9,196 \pm 0,015$ g EAG/100g (REYES, 2011) y en el cacao porcelana sin fermentar en la primera cosecha fue 92,79 mg EAG/g y en la segunda fue 53,52 mg EAG/g (PORTILLO, 2012).

Cuadro 11. Cuantificación de polifenoles totales en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Muestras	Tratamiento	g EAG/100 g
Sin nibs	T1	2,351±0,066 ^c
Con nibs porcelana fermentado	T2	2,208±0,037 ^c
Con nibs CCN-51 fermentado	T3	2,369±0,037 ^c
Con nibs criollo fermentado	T4	2,151±0,063 ^c
Con nibs porcelana no fermentado	T5	2,738±0,046 ^{ab}
Con nibs CCN-51 no fermentado	T6	2,923±0,017 ^a
Con nibs criollo no fermentado	T7	2,654±0,074 ^b

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

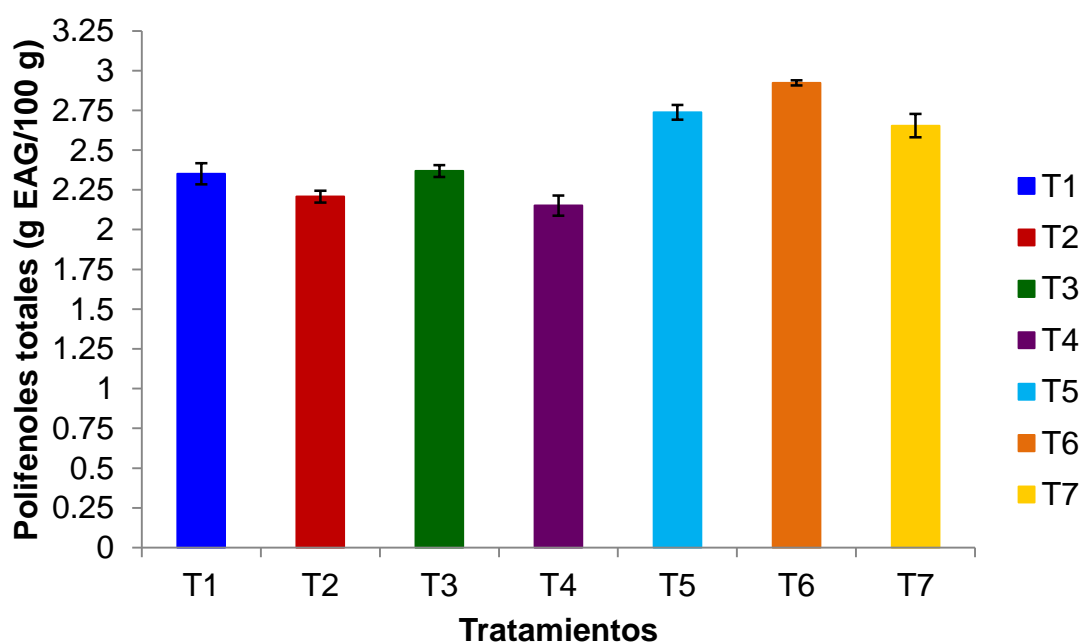


Figura 14. Representación del contenido de polifenoles totales en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Del mismo Cuadro 11 y Figura 14 podemos apreciar que el chocolate bitter testigo T1 (sin nibs) tuvo $2,351 \pm 0,066$ g EAG/100 g que fue estadísticamente igual a los tratamientos T2 (con nibs porcelana fermentado) $2,208 \pm 0,037$, T3 (con nibs CCN-51 fermentado) $2,369 \pm 0,037$ y T4 (con nibs criollo fermentado) $2,151 \pm 0,063$ g EAG/100 g, como podemos apreciar todos los chocolates bitter tuvieron inclusión de nibs fermentados, al respecto ARLORIO *et al.* (2008) indica que los polifenoles en granos de cacao fermentado disminuyen porque éstas se difunden en los fluidos celulares, desde las células almacenadas y sufren oxidación por la condensación de moléculas de taninos, por reacciones enzimáticas catalizadas por el polifenol oxidasa. ZAPATA *et al.* (2013) menciona que las pérdidas de fenoles totales son debido a que durante la fermentación los compuestos fenólicos pueden acomplejarse con proteínas, polisacáridos y alcaloides del cacao.

En los chocolates bitter sin nibs y con inclusión de nibs fermentados y no fermentados el contenido de polifenoles totales varió entre $2,151 \pm 0,063$ a $2,923 \pm 0,017$ g EAG/100 g, este rango reportado se encuentra dentro de lo citado por PEREA *et al.* (2009) el contenido de polifenoles en chocolate amargo es tres veces superior ($33,98 \pm 3,13$ mg EAG/g muestra) a la determinada en el chocolate de mesa con azúcar ($12,56 \pm 1,99$ mg EAG/g muestra). El contenido de polifenoles en chocolates oscuros tiende a estar entre $12,30 \pm 0,10$, $11,73 \pm 0,35$ y $14,88 \pm 0,37$ mg/g de EAG (MILLER *et al.*, 2006).

4.2. Cuantificación de antocianinas en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados

En el Cuadro 12 y Figura 15 se presenta los resultados del contenido de antocianinas en los chocolates bitter, según el análisis estadístico (A-VI) se encontró diferencia altamente significativa, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) podemos apreciar que el mayor contenido de antocianinas se encontraron en los tratamientos T6 (con nibs CCN-51 no fermentado) $0,072 \pm 0,002$ y T7 (con nibs criollo no fermentado) $0,071 \pm 0,004$ mg/cianidin-3-glucósido/g muestra, estos tratamientos tuvieron inclusión de nibs no fermentados, según lo reportado por AIKPOKPODION y DONGO (2010) los granos de cacao no fermentado contienen 135 g/Kg de compuestos polifenólicos, de la cual un 4% lo constituye antocianinas y proantocianidinas, además, en granos de cacao maduros sin fermentar, los forasteros poseen más de 4 mg de antocianinas, mientras que los cacaos criollos e híbridos (trinitario), la concentración de antocianinas esta entre 0,1 y 2,3 mg/g (MÁRQUEZ, 2009). En lo reportado por REYES (2011) los granos de cacao CCN-51 y criollo sin fermentar y secado tuvieron un contenido de antocianinas de $3,138 \pm 0,011$ y $2,285 \pm 0,005$ mg cianidina-3-glucósido/g.

Cuadro 12. Cuantificación de antocianinas en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Muestras	Tratamiento	mg cianidin-3-glucósido/g muestra
Sin nibs	T1	0,026±0,003 ^b
Con nibs porcelana fermentado	T2	0,022±0,003 ^b
Con nibs CCN-51 fermentado	T3	0,029±0,002 ^b
Con nibs criollo fermentado	T4	0,029±0,003 ^b
Con nibs porcelana no fermentado	T5	0,025±0,002 ^b
Con nibs CCN-51 no fermentado	T6	0,072±0,002 ^a
Con nibs criollo no fermentado	T7	0,071±0,004 ^a

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

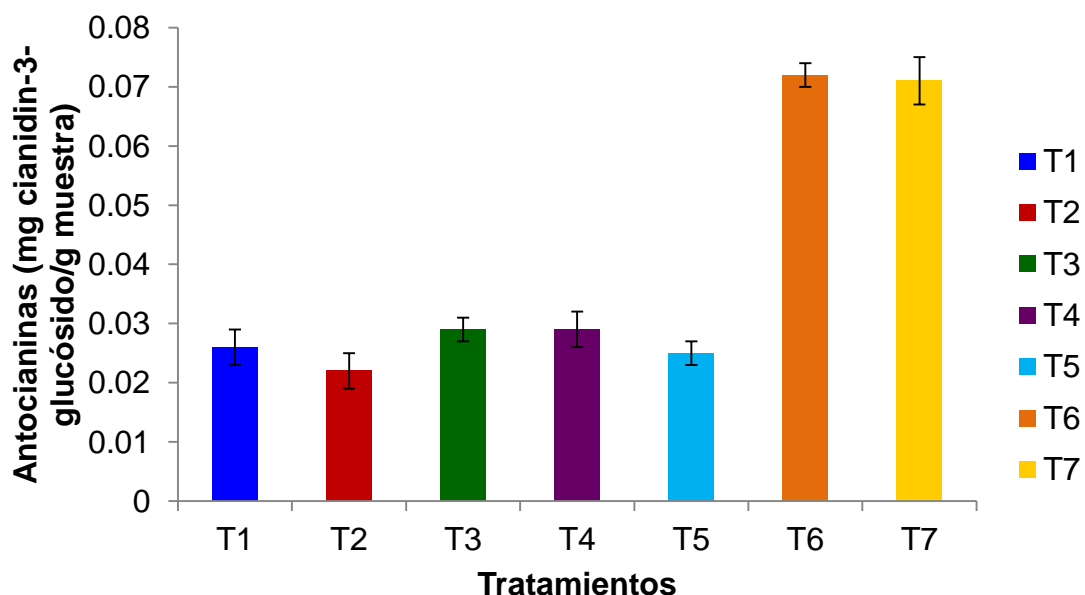


Figura 15. Representación del contenido de antocianinas en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Del mismo Cuadro 12 y Figura 15 podemos apreciar que el chocolate bitter testigo T1 (sin nibs) tuvo $0,026\pm 0,003$ mg cianidin-3-glucósido/g muestra que fue estadísticamente igual a los tratamientos T2 (con nibs porcelana fermentado) $0,022\pm 0,003$, T3 (con nibs CCN-51 fermentado) $0,029\pm 0,002$, T4 (con nibs criollo fermentado) $0,029\pm 0,003$ y T5 (con nibs porcelana no fermentado) $0,025\pm 0,002$ mg cianidin-3-glucósido/g muestra, como podemos apreciar todos los chocolates bitter tuvieron inclusión de nibs fermentados, en excepción el T5 que tuvo inclusión de nibs porcelana no fermentado, esto probablemente se debe al color de las semillas, según CHACÓN *et al.* (2011) los cotiledones del cacao porcelana son de color blanco o rosado pálido; mientras que el CCN-51 y criollo tienen color violeta o púrpura, NIEMENAK *et al.* (2006) indica que los granos frescos de cacao contienen pigmentos de antocianinas de color púrpura, cianidins 3- β galactosyl y cianidins 3- α -L-arabinosyl y durante la fermentación estos pigmentos son hidrolizados por glucósidos resultando un cambio del cotiledón de violeta a marrón. En granos de cacao los valores varían entre 0,59 y 1,60 mg/g en granos sin fermentar, así como 0,27 y 1,05 mg/g en granos fermentados (ZAPATA, 2013). En los cacaos CCN-51 y criollo tuvieron $0,425\pm 0,003$ y $0,424\pm 0,004$ mg cianidina-3-glucósido/g respectivamente (NAZARIO, 2014).

En los chocolates bitter sin nibs y con inclusión de nibs fermentados y no fermentados el contenido de antocianinas varió entre $0,022\pm 0,003$ a $0,072\pm 0,002$ mg cianidina-3-glucósido/g muestra, CASIQUE (2014) reportó que el contenido de antocianinas totales en licor de cacao fue $0,147\pm 0,003$, chocolate para taza $0,145\pm 0,001$ y cobertura de chocolate

0,023±0,001 mg cianidina-3-glucósido/g de muestra y CHAVEZ (2012) obtuvo 0,162±0,007 mg cianidina-3-glucósido/g de muestra en licor de cacao.

4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados

4.3.1. Coeficiente de inhibición (IC₅₀) del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

En el Cuadro 13 y Figura 16 se presenta los resultados de la evaluación de la capacidad de inhibir al radical DPPH (IC₅₀) en los chocolates bitter, este radical es muy útil para evaluar la capacidad antioxidante tal como indica PADILLA *et al.* (2008) que la capacidad antioxidante está asociada a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno y estos antioxidantes reaccionan con el DPPH; la cual reduce un número de moléculas de DPPH iguales para el número de grupos hidroxilo disponibles (XI *et al.*, 2011). Según el análisis estadístico (A-VII) se encontró diferencia altamente significativa, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), podemos indicar que la mayor eficiencia para inhibir el radical DPPH lo tuvieron el T6 (con nibs CCN-51 no fermentado) IC₅₀ 0,172±0,002 mg/mL, T7 (con nibs criollo no fermentado) IC₅₀ 0,189±0,004 mg/mL y T5 (con nibs porcelana no fermentado) IC₅₀ 0,196±0,004 mg/mL, como podemos apreciar los tres tratamientos fueron los chocolates elaborados con inclusión de nibs no fermentados, cabe indicar que también fueron los que tuvieron el mayor contenido de polifenoles totales, tal como lo cita EFRAIM *et*

al. (2010) que las semillas de cacao tienen 6 – 8% de compuestos fenólicos en peso seco y según STAHL *et al.* (2009) la actividad antioxidante está determinada por el contenido de flavonoles como (-)epicatequina y (+)catequina, entre otros oligómeros conocidos como proantocianidinas. De los tratamientos, numéricamente el más eficiente al DPPH fue el que tuvo inclusión de nibs CCN-51 no fermentado IC_{50} $0,172\pm 0,002$ mg/mL y polifenoles totales $2,923\pm 0,017$ g EAG/100 g; esto concuerda con lo reportado por HUANCA (2010) en grano fresco el CCN-51 tuvo una mayor eficiencia frente al radical DPPH IC_{50} $38,754\pm 0,52$ μ g/mL y un mayor contenido de polifenoles $9,209\pm 0,034$ g EAG/100 g. REYES (2011) reporta en CCN-51 sin fermentar el mayor IC_{50} de $35,557\pm 0,086$ μ g/mL.

Cuadro 13. Resultados del IC_{50} del radical DPPH en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Muestras	Tratamiento	IC_{50} (mg/mL)	1/ IC_{50}
Sin nibs	T1	$0,239\pm 0,008^a$	4,184
Con nibs porcelana fermentado	T2	$0,234\pm 0,007^{ab}$	4,274
Con nibs CCN-51 fermentado	T3	$0,238\pm 0,012^a$	4,202
Con nibs criollo fermentado	T4	$0,245\pm 0,014^a$	4,082
Con nibs porcelana no fermentado	T5	$0,196\pm 0,004^{bc}$	5,102
Con nibs CCN-51 no fermentado	T6	$0,172\pm 0,002^c$	5,814
Con nibs criollo no fermentado	T7	$0,189\pm 0,004^c$	5,291

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

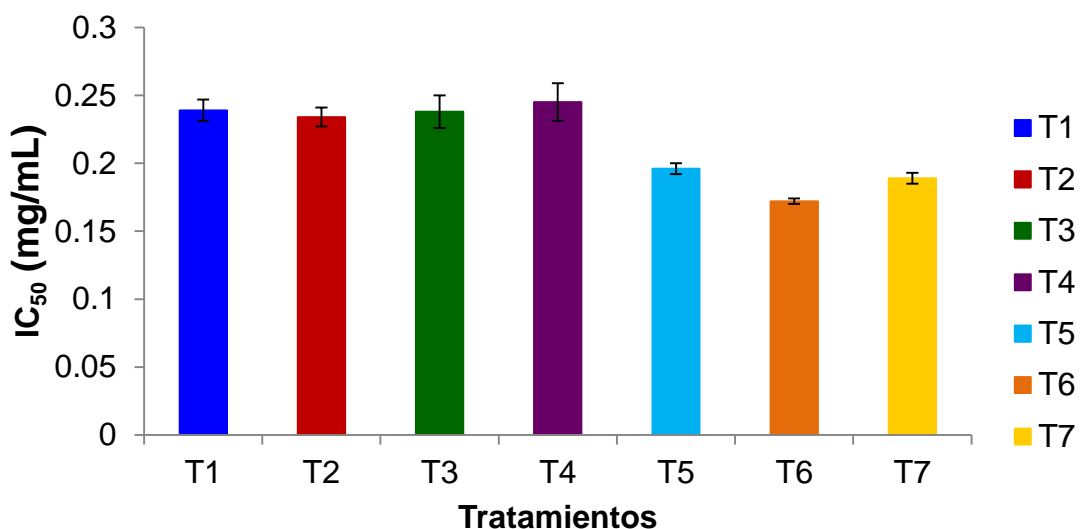


Figura 16. Comportamiento del IC₅₀ con el radical DPPH en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Del mismo Cuadro 13 y Figura 16 podemos indicar que la menor eficiencia frente al radical DPPH lo presentaron el chocolate bitter testigo T1 (sin nibs) IC₅₀ 0,239±0,008 mg/mL que fue estadísticamente igual a los tratamientos T2 (con nibs porcelana fermentado) IC₅₀ 0,234±0,007 mg/mL, T3 (con nibs CCN-51 fermentado) IC₅₀ 0,238±0,012 mg/mL y T4 (con nibs criollo fermentado) IC₅₀ 0,245±0,014 mg/mL, como podemos apreciar todos los chocolates bitter tuvieron inclusión de nibs fermentados, al respecto podemos indicar que durante el proceso de fermentación se produce pérdidas de los compuestos fenólicos tal como lo indica EFRAIM *et al.* (2010) y REYES (2011) que el porcentaje de degradación frente al radical DPPH del grano criollo fresco a fermentado es 47,2% y del CCN-51 es de 48,1%. Por otro lado cabe resaltar que el proceso de elaboración también puede afectar la capacidad antioxidante tal como lo cita SULISTYOWATI y MISNAWI (2008) la actividad antioxidante y

la concentración de polifenoles en el chocolate se redujeron más durante la aplicación de calor en el conchado que en la alcalinización.

En los chocolates bitter sin nibs y con inclusión de nibs fermentados y no fermentados el contenido de IC_{50} varió entre $0,172\pm 0,002$ a $0,245\pm 0,014$ mg/mL, cabe indicar que el resultado fue mucho mejor en la investigación reportado por PEREA *et al.* (2009) respecto a la inhibición del chocolate amargo IC_{50} $0,40\pm 0,06$ mg/mL. Así mismo, en la elaboración del chocolate se incluyó licor de cacao 60%, esto posiblemente sea la razón para que el producto tenga buena capacidad para reducir al radical DPPH, según BELSCAK *et al.* (2009) los resultados del DPPH en extracto metanólico de chocolates al 88% $11,68\pm 0,09$ mmol/L Trolox, chocolate de 72% $11,62\pm 0,15$ mmol/L Trolox y chocolate de 60% $11,47\pm 0,13$ mmol/L Trolox. Los estudios realizados por ORDÓÑEZ *et al.* (2012) reporto una mayor eficiencia el chocolate para taza sol de Tingo María IC_{50} $0,12\pm 0,01$ mg/mL, según la especificación de ingredientes está contiene 75% pasta de cacao, y se sabe que a mayor cantidad de polifenoles mayor capacidad antioxidante.

Con los resultados presentados en la Figura 17 referente al contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante frente al radical DPPH se realizó la correlación cinética logrando un $R^2 = 0,9127$, este coeficiente indica que el contenido de polifenoles totales es predominante en la capacidad antioxidante, RADOJCIC *et al.* (2009) indico que la capacidad antioxidante está relacionado con el contenido de polifenoles reportando una correlación de $R^2 = 0,9868$ de DPPH.

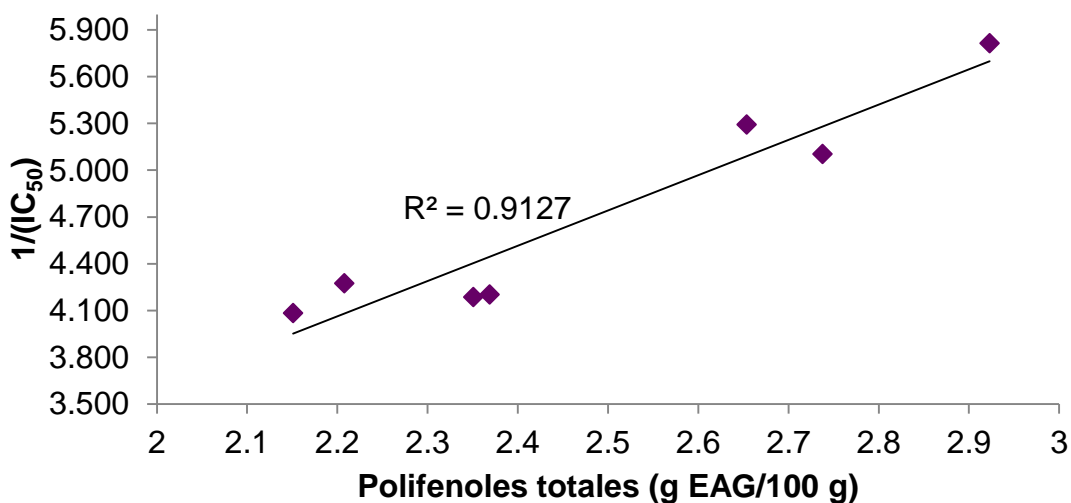


Figura 17. Correlación entre el contenido de polifenoles totales y la eficiencia de la actividad antioxidante.

4.3.2. Coeficiente de inhibición (IC₅₀) del radical libre 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS⁰⁺)

En el Cuadro 14 y Figura 18 se presenta los resultados de la evaluación de la capacidad de inhibir al radical ABTS⁰⁺ (IC₅₀) en los chocolates bitter, según el análisis estadístico (A-VIII) se encontró diferencia altamente significativa, comparando los promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$), podemos indicar que la mayor eficiencia para inhibir el radical ABTS⁰⁺ lo tuvieron el T6 (con nibs CCN-51 no fermentado) IC₅₀ 0,053±0,002 mg/mL, T7 (con nibs criollo no fermentado) IC₅₀ 0,054±0,002 mg/mL y T5 (con nibs porcelana no fermentado) IC₅₀ 0,055±0,002 mg/mL, como podemos apreciar los tres tratamientos fueron los chocolates elaborados con inclusión de nibs no fermentados, cabe indicar que también fueron los que tuvieron la mayor capacidad de inhibición frente al radical DPPH y el mayor contenido de

polifenoles totales; MISNAWI *et al.* (2002) indica que los granos de cacao forastero no fermentados contienen 120 – 180 g/Kg de compuestos fenólicos y se ha identificado tres grupos de polifenoles, las catequinas o flavan-3-oles, antocianinas y proantocianidinas y según GUTIÉRREZ (2002) los compuestos fenólicos como la catequina y proantocianidinas tienen una fuerte actividad antioxidante *in vitro*. De los tratamientos, numéricamente el más eficiente al ABTS⁰⁺ fue la inclusión con nibs CCN-51 no fermentado IC₅₀ 0,053±0,002 mg/mL, seguido por la inclusión con nibs criollo no fermentado IC₅₀ 0,054±0,002 mg/mL, según lo reportado por REYES (2011) en grano sin fermentar en CCN-51 IC₅₀ 30,101±0,061 µg/mL y criollo IC₅₀ 31,317±0,071 µg/mL, este resultado puede deberse a que los cacaos del grupo forastero contienen 30 a 60% más compuestos fenólicos que los del grupo criollo (EFRAIM *et al.*, 2011). La variación también puede deberse a lo indicado por FENGLIN *et al.* (2013) que las condiciones meteorológicas (microclima y luz solar) y la intensidad de la luz (posición de las vainas en el árbol a la luz solar directa) influyen en el contenido de antioxidantes de los granos de cacao recién cosechados. Factores intrínsecos del propio vegetal (origen genético), llevan a que la composición de polifenoles sea diferente no sólo entre distintos géneros o especies, sino incluso también entre variedades de un mismo producto (TOMÁS, 2003).

Cuadro 14. Resultados del IC₅₀ del radical ABTS⁰⁺ en chocolates bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Muestras	Tratamiento	IC ₅₀ (mg/mL)
Sin nibs	T1	0,075±0,002 ^a
Con nibs porcelana fermentado	T2	0,072±0,003 ^a
Con nibs CCN-51 fermentado	T3	0,065±0,002 ^{abc}
Con nibs criollo fermentado	T4	0,066±0,004 ^{ab}
Con nibs porcelana no fermentado	T5	0,055±0,002 ^{bc}
Con nibs CCN-51 no fermentado	T6	0,053±0,002 ^c
Con nibs criollo no fermentado	T7	0,054±0,002 ^c

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

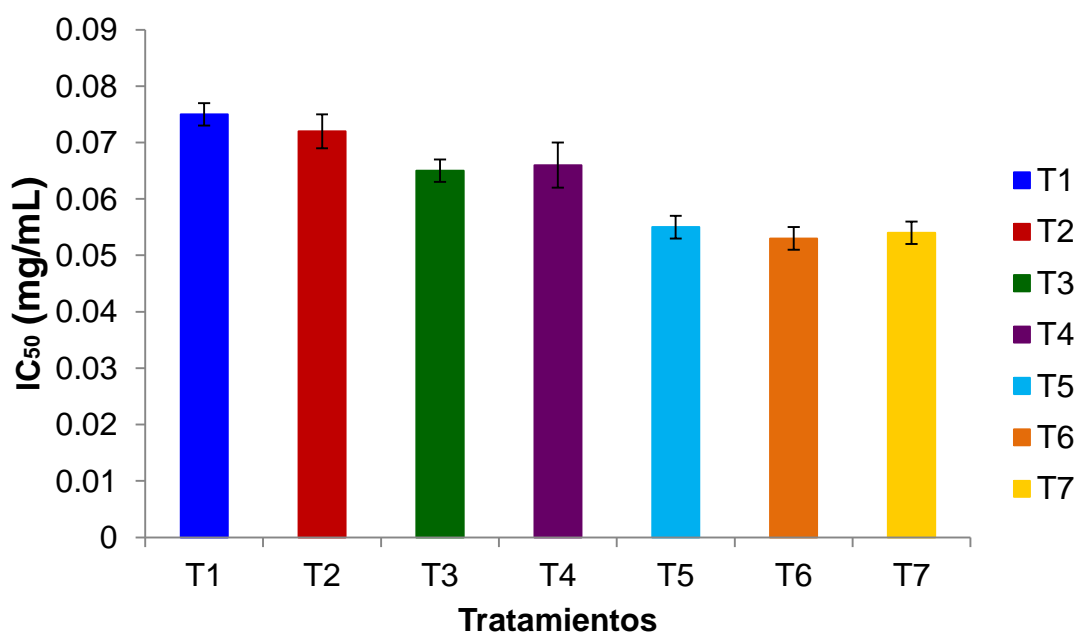


Figura 18. Comportamiento del IC₅₀ con el radical ABTS⁰⁺ en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Del mismo Cuadro 14 y Figura 18 podemos indicar que la menor eficiencia frente al radical $ABTS^{0+}$ lo presentaron el chocolate bitter testigo T1 (sin nibs) IC_{50} $0,075\pm 0,002$ mg/mL que fue estadísticamente igual a los tratamientos T2 (con nibs porcelana fermentado) IC_{50} $0,072\pm 0,003$ mg/mL, T3 (con nibs CCN-51 fermentado) IC_{50} $0,065\pm 0,002$ mg/mL y T4 (con nibs criollo fermentado) IC_{50} $0,066\pm 0,004$ mg/mL, como podemos apreciar todos los chocolates bitter tuvieron inclusión de nibs fermentados, al respecto AIKPOKPODION y DONGO (2010) indica que los polifenoles es la principal especie química en el cacao que es responsable de la capacidad antioxidante, durante la fermentación y el secado se reduce el contenido de polifenoles, por tanto la capacidad antioxidante también se reduce, lo cual concuerda con lo explicado por MISNAWI *et al.* (2002) que los sustratos del polifenol oxidasa y fenólicos están separados dentro de las células, sin embargo, cualquier tratamiento que dañen estas células, la enzima y los sustratos pueden entrar en contacto, permitiendo la rápida oxidación de los fenoles.

En los chocolates bitter sin nibs y con inclusión de nibs fermentados y no fermentados el contenido de IC_{50} varió entre $0,053\pm 0,002$ a $0,075\pm 0,002$ mg/mL, según BELSCAK *et al.* (2009) los resultados del $ABTS^{0+}$ de chocolates en extracto de metanol fueron en el chocolate de 88% $20,40\pm 0,06$ mmol/L Trolox, chocolate de 72% $17,73\pm 0,19$ mmol/L y chocolate de 60% $18,01\pm 0,21$ mmol/L Trolox. Los estudios realizados por PEREA (2009) reporto una mayor actividad antioxidante en el chocolate amargo ($270,11\pm 82,40$ mmol Trolox/Kg), mientras que los demás chocolates presentaron una actividad antioxidante 2,5 veces menor debido a que esos

productos contenían aproximadamente un 30% de licor de cacao; cabe resaltar que el chocolate deberá contener, referido al extracto seco, no menos del 35% de extracto seco total de cacao, del cual el 18% por lo menos será manteca de cacao y el 14% por lo menos extracto seco magro de cacao (CODEX STAN 87-1981, 2003).

4.4. Evaluación sensorial de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados

En el Cuadro 15 se presenta los resultados de los promedios de de cada atributo evaluado, en la Figura 18 (análisis descriptivo cuantitativo – QDA) muestra gráficamente el perfil sensorial de cada muestra de chocolate, el punto cero es el centro de la escala descriptor, la intensidad va en aumento hacia los extremos de la figura. Para cada muestra el valor medio de cada descriptor es marcado en el eje correspondiente y el perfil sensorial se dibuja mediante la conexión de dichos puntos.

Con respecto al **atributo color**, el puntaje en todos los tratamientos incluido T1 (sin nibs) correspondió a un calificativo entre 3,5 – 4 “marrón intenso”, que significa que las muestras poseen un color intenso a marrón, puede deberse a que son chocolates bitter de 60%, tal como lo indica REQUENA (2012) el color ayuda a diferenciar el porcentaje de cacao que tengan las coberturas y chocolates, mientras mayor sea el porcentaje de cacao más oscura será la cobertura o chocolate, siendo prácticamente negra la cobertura con un 99% de cacao. Con respecto a las variedades y la raza de cacao podemos indicar que no afectaron en la intensidad del color de las

muestras de chocolates; al respecto KOWALSKA y SIDORCZUK (2007) indica que la fermentación y secado de los granos de cacao conduce a la hidrólisis de antocianinas a antocianidinas que luego condensado con catequinas, taninos, dan a los granos de cacao su color marrón característico. Los atributos típicos de los granos, como el tamaño, sabor, color y composición química varían considerablemente según las variedades (REYES, 2011).

Para el **atributo brillo**, según el resultado de la evaluación sensorial la muestra con menor puntaje fue el tratamiento T5 (con nibs porcelana no fermentado) con un calificativo 3,3 “brillo moderado”; la fase grasa es la responsable del brillo, dureza, fracturabilidad, estabilidad al calor, sensación en la boca, liberación del aroma y en general de la satisfacción del consumidor (ALVIS *et al.*, 2011). MÁRQUEZ (2009), indica que las procianidinas también se encuentran en diferentes proporciones dependiendo del cultivar, estas asocian la intensidad del color y las cualidades de amargor y astringencia de los granos pigmentados.

Los demás tratamientos incluyendo al T1 (sin nibs) tuvieron un mayor puntaje según los resultados con un calificativo entre 3,5 – 3,8 “brillo intenso”, este atributo es muy importante en la evaluación de un chocolate y puede ser afectado por el procesamiento del mismo, al respecto TORRES (2012) cita que el atemperado del chocolate es el proceso en que se consigue la cristalización de las moléculas de la manteca de cacao, de las seis posibles formas polimórficas se considera que solo la forma V, es estable y por tanto es la deseable, dando un aspecto brillante, buen chasquido, contracción y resistencia a la migración de grasas en el chocolate final.

Cuadro 15. Promedio del perfil sensorial de las muestras de chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados.

Muestras	Tratamiento	Color	Brillo	Chocolate/Cacao	Frutal	Floral	Amargor	Acidez	Astringencia	Ductibilidad	Granulosidad
Sin nibs	T1	3,8	3,8	3,7	1,7	1,7	3,2	2,8	2,7	3,2	1,2
Con nibs porcelana fermentado	T2	3,7	3,8	3,8	2,5	2,3	3,3	3,3	3,3	3,3	2,2
Con nibs CCN-51 fermentado	T3	3,7	3,5	3,7	2,3	1,7	3,2	2,8	2,8	3,2	1,8
Con nibs criollo fermentado	T4	4,0	3,5	3,8	2,0	1,7	3,3	3,0	2,5	3,0	1,8
Con nibs porcelana no fermentado	T5	3,7	3,3	3,3	2,2	1,3	3,7	3,2	2,7	3,0	1,7
Con nibs CCN-51 no fermentado	T6	3,5	3,5	3,5	1,7	1,8	3,5	2,8	2,7	3,2	1,5
Con nibs criollo no fermentado	T7	4,0	3,5	3,5	2,0	1,5	3,8	3,0	3,0	3,0	2,0

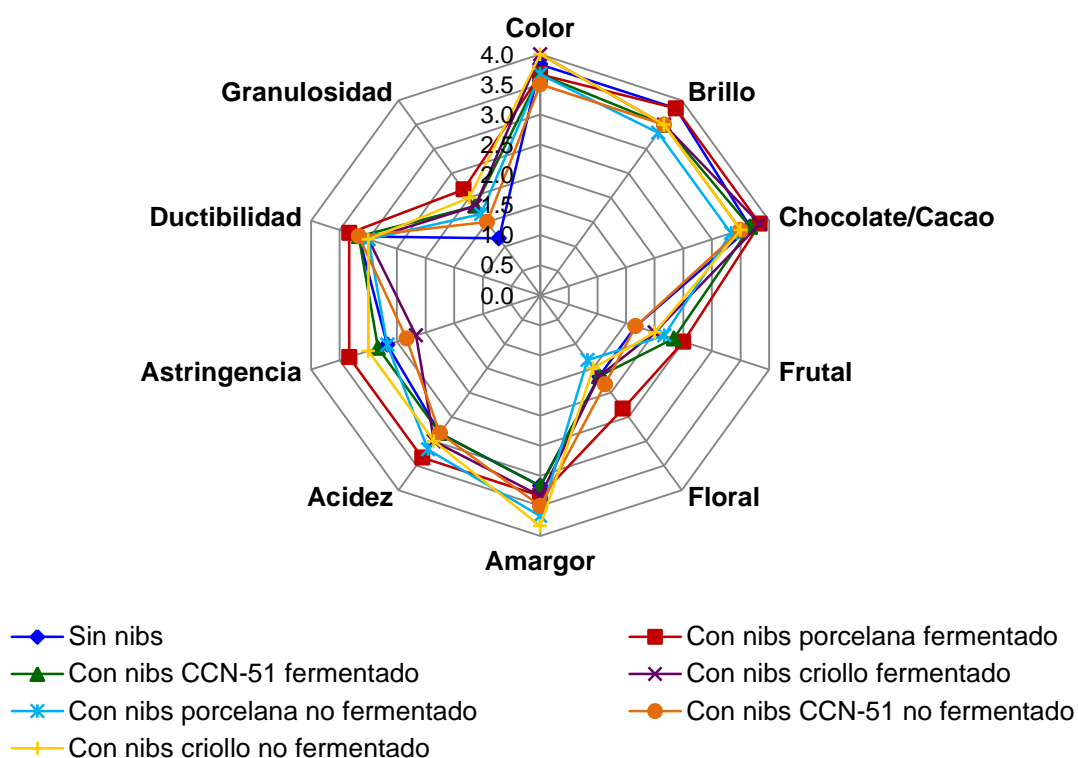


Figura 19. Perfil sensorial de las muestras de chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados.

Del mismo Cuadro 15 y Figura 19 donde se muestran los promedios de cada atributo evaluado con el análisis descriptivo cuantitativo (QDA), con respecto al **atributo aroma y sabor chocolate/cacao** la muestra con menor puntaje fue el tratamiento T5 (con nibs porcelana no fermentado) con un calificativo 3,3 “moderado aroma y sabor chocolate/cacao”, este calificativo puede deberse a lo citado por GONZÁLEZ *et al.* (2012) los granos sin fermentar desarrollan poco sabor y aroma a chocolate luego del tostado. Globalmente, los cacaos no fermentados generan un chocolate con aromas poco intensos y poco sabor a cacao, es fuertemente amargo y astringente, también es poco ácido y afrutado (PORTILLO *et al.*, 2011).

El T1 (sin nibs) y los demás tratamientos tuvieron un mayor puntaje con un calificativo entre 3,5 – 3,8 “intenso aroma y sabor chocolate/cacao”, esto puede deberse a la tetrametilpirazina, es uno de los componentes en el aroma de chocolate, este tipo de compuestos se ven formados a partir de aminoácidos libres, L-serina y L-treonina potenciando el aroma característico a chocolate con temperaturas mayores a los 120°C (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012). También (PORTILLO *et al.*, 2011) menciona que la fermentación es el proceso fundamental en el beneficio del cacao, debido a que durante este proceso se desarrolla el sabor y aroma del grano. Las diferencias en origen genético, la variedad de cacao y la duración de la fermentación influyen en el perfil del sabor y aroma (GONZÁLES *et al.*, 2012).

Con respecto al **atributo aroma y sabor frutal** según los resultados de los evaluadores el tratamiento T2 (con nibs porcelana fermentado) tuvo el mayor puntaje con un calificativo 2,5 “moderado aroma y sabor frutal”. El porcelana es un fruto aromático, afrutado y dulce también presenta un delicado aroma de chocolate acompañado por un sabor de nuez suave y frutal (GIL, 2012), así mismo PALACIOS (2008) indica que se requieren dos a tres días para fermentar, es muy aromático y se denomina comercialmente como “cacao fino”, presentando un sabor a chocolate, nuez y frutas muy apetecido. Por otro lado cabe resaltar que los procesos de tostado bajos acentúan el aroma frutal (WILBUR COMPANY, 2010).

Los demás tratamientos incluyendo T1 (sin nibs) obtuvieron un menor puntaje con el calificativo en el rango 1,7 – 2,3 “leve aroma y sabor frutal”; GONZÁLES *et al.* (2012) indica que el aroma afrutado en el cacao está

fuertemente correlacionado con la acidez, la cual aumenta en la etapa de fermentación, este atributo también puede deberse a los alcoholes superiores, producidos por las levaduras durante la fermentación, también DÍAZ y PINOARGOTE (2012) hace mención que el aroma a frutal están asociados al sabor a piña, otros esteres que desarrollan el aroma frutal son el 2-feniletilacetato y 3-metil-q-butanol acetato.

Para el resultado del atributo **aroma y sabor floral** los evaluadores calificaron con el menor puntaje 1,3 al tratamiento T5 (con nibs porcelana no fermentado) “ningun aroma y sabor floral”, esto puede atribuirse a que los nibs de porcelana no estaban fermentadas, según PORTILLO *et al.* (2011) las notas de acidez, sabor a frutal y floral son más bajos en los cacaos no fermentados; además el cacao criollo variedad porcelana tiene una baja acidez y astringencia, un amargor medio, floral muy bajo y frutal bajo (GARCÍA, 2010).

Las muestras de chocolate con mayor puntaje fueron todos los tratamientos restantes incluido T1 (sin nibs) con un calificativo entre 1,5 – 2,3 “leve aroma y sabor floral”, con respecto a este atributo SÁNCHEZ (2007) indica que tienen sabor y aroma a flores, casi perfumados como a flores cítricas los granos fermentados; además las levaduras provocan un potenciamiento del 2-fenilacetato, que pertenece al grupo de los esteres y está relacionado al aroma floral. También se ven potenciados a partir de aminoácidos libres como 1-feniletanol, benzil alcohol, 2-feniletaol, 2-heptona, acetofenona, etil octanoato y bencil acetato (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012). En estos tratamientos tenemos a los nibs criollo y CCN-51 fermentados y no fermentados, en sus evaluaciones NAZARIO (2014) con respecto al CCN-51 en licor de cacao obtuvo un

calificativo de floral de 0,8 “muy poca presencia floral” y GARCÍA (2010) hace mención que el cacao criollo tiene bajo aroma floral.

Respecto al **atributo amargor** las muestras con mayor puntaje fueron el tratamiento T5 (con nibs porcelana no fermentado), T6 (con nibs CCN-51 no fermentado) y T7 (con nibs criollo no fermentado) con un calificativo entre 3,5 – 3,8 “amargor intenso”, este sabor fuerte y amargo, puede ser debido a la falta de fermentación, la cual se percibe en la parte posterior de la lengua o en la garganta se relaciona con el café, cerveza caliente y la toronja (SÁNCHEZ, 2007). Entre sus resultados de NAZARIO (2014) el cacao criollo es el que presentó mayor sabor a amargo; por otra parte el clon CCN-51, se caracteriza por notas altas de astringencia y acidez (DÍAZ y PINOARGOTE, 2012).

Los tratamientos T1 (sin nibs), T2 (con nibs porcelana fermentado), T3 (con nibs CCN-51 fermentado) y T4 (con nibs criollo fermentado) presentaron un calificativo entre 3,2 – 3,3 “amargor moderado”, la presencia de este atributo en los chocolates puede deberse a lo citado por DÍAZ y PINOARGOTE (2012) quien hace mención que durante la fermentación, el contenido de teobromina y cafeína se reduce entre el 20 y 30%, contribuyendo el descenso en el nivel de amargor de los granos al reducirse el aporte de la teobromina en la expresión de este rango sensorial. ADRIAZOLA (2003) indica que los granos de cacao secos presentan amargor debido a la presencia de cafeína y teobromina. En la fermentación durante la fase aeróbica ocurren reacciones mediadas por el oxígeno, tales como la oxidación de los complejos proteínas-polifenol, este complejo reduce la astringencia y la amargura. LUNA

et al. (2002) menciona que los polifenoles son responsables del sabor amargo que se desarrollan durante el tostado.

Para el **atributo acidez** el puntaje en todos los tratamientos incluido T1 (sin nibs) correspondieron a un calificativo entre 2,8 – 3,3 “acidez moderada”, el contenido de ácidos orgánicos compuestos aportan acidez al perfil sensorial del cacao, la cual varía entre el 1,2% y 1,6% entre ellos el ácido acético, cítrico y oxálico que se forma durante la fermentación (ARMIJOS, 2002). Procesos de tostado bajos acentúan aroma frutal y acidez, preferidos en Europa porque dan como resultado en el chocolate características de ácido leve (WILBUR COMPANY, 2010).

Con respecto al **atributo astringencia** todos los tratamientos incluyendo T1 (sin nibs) tuvieron un puntaje entre 2,5 – 3,3 “astringencia moderada”. Este comportamiento puede deberse a que la fermentación disminuye las propiedades astringentes del amargor del grano, este efecto se atribuye a la pérdida de polifenoles y flavan-3-oles durante la fermentación (MILLER *et al.*, 2006). La alta astringencia, está determinado por los compuestos polifenólicos, a medida que transcurre el tiempo de fermentación disminuye la astringencia de los granos, la alta astringencia indica que los granos no han alcanzado el óptimo índice de fermentación (LUNA *et al.*, 2002).

Los resultados para el **atributo ductibilidad** de los tratamientos incluido T1 (sin nibs) tuvieron puntajes similares con un calificativo entre 3,2 – 3,3 “ductibilidad moderada”, una de las características de un buen chocolate es la ductibilidad, debe deformarse de a poco al estar en contacto con la temperatura corporal, GARCÍA (2011) indica que se coge un pedacito de

pastilla entre el índice y el pulgar, para valorar su ductibilidad o la capacidad de no deformarse cuando entra en contacto con el calor de los dedos. AFOAKWA (2010) indica que los chocolates debe ser sólidos a 20 – 27°C y derretirse levemente a temperatura corporal (37°C) durante su consumo.

Para el **atributo granulosidad** el tratamiento que obtuvo el menor puntaje fue T1 (sin nibs) con un calificativo de 1,2 “ninguna granulosidad”, esta referido a que los chocolates no deben existir partículas grandes y grotescas, según TORRES (2012) indica que el tamaño de partículas en el chocolate debe ser lo suficientemente pequeño para que no se note arenoso cuando se coma.

Los demás tratamientos obtuvieron un puntaje entre 1,5 – 2,2 “leve granulosidad”, esto se debe a la inclusión de los nibs de cacao al chocolate, según WALKER (2013) el tamaño de partícula de un chocolate dependera del tipo de chocolate, para los gourment oscilan entre 8 – 12 μm , cacao alto debe estar entre 15 – 27 μm , los populares entre 19 – 25 μm y el valor consciente debe estar entre 28 μm – 40 μm .

Los resultados de la evaluación sensorial referido al perfil de atributos realizados a las muestras de chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados de cacao porcelana, CCN-51 y criollo, fueron analizados mediante componente principales (A-IX) y (A-X), según los resultados estadísticos podemos concluir que en el biplot de variables del primer componente (**CP1**) separa el atributo amargor de las demás variables, el cual representa el 40,2% de la variabilidad total del perfil sensorial de los atributos del chocolate (Figura 20). Así mismo, el atributo granulosidad del chocolate bitter representa el 30,0% de la variabilidad del segundo componente

(CP2) y en general ambos componentes representan el 70,2% de la variabilidad total. De los resultados podemos indicar que el atributo amargor permitió determinar en qué medida se logró diferenciar los chocolates con nibs fermentados y no fermentados, las muestras que tuvieron mas amargor fueron los chocolates con nibs no fermentados, según PORTILLO *et al.* (2011) las notas de amargor y astringencia son las más elevadas en los granos no fermentados; REYES (2011) indica que los granos no fermentados no desarrollan ningún sabor a chocolate después del tostado y son excesivamente astringentes y amargos; mientras que la intensidad aromática, la acidez y el sabor a cacao aumentan durante la fermentación, la astringencia y el amargor disminuyen; además RAMOS (2007) hace mención que los granos de cacao que no son fermentados desarrollan almendras pizarrosas, no desarrollan el sabor y el aroma característico, quedándose con un alto contenido de amargor y astringencia. WILBUR COMPANY (2010) reporta que los forasteros peruanos tienen sabor levemente amargo y frutal, las diferencias en el aroma dependen del origen del grano, la línea genética, las diferentes prácticas de fermentación y las condiciones de tostado.

El CP2 fue representado por el atributo de granulosidad cuya variabilidad representó el 30,0% permitiendo diferenciar los tratamientos realizados (con nibs fermentados y no fermentados) del T1 (sin nibs); el chocolate tiene una propiedad única de sensación en la boca debido a que la manteca de cacao tiene un punto de fusión bajo, muy cercano a la temperatura del cuerpo. El tamaño de las partículas de chocolate es también

extremadamente importante en la sensación suave de la muestra en la boca, lo cual es parte del atractivo de este producto (ALVIS *et al.*, 2011).

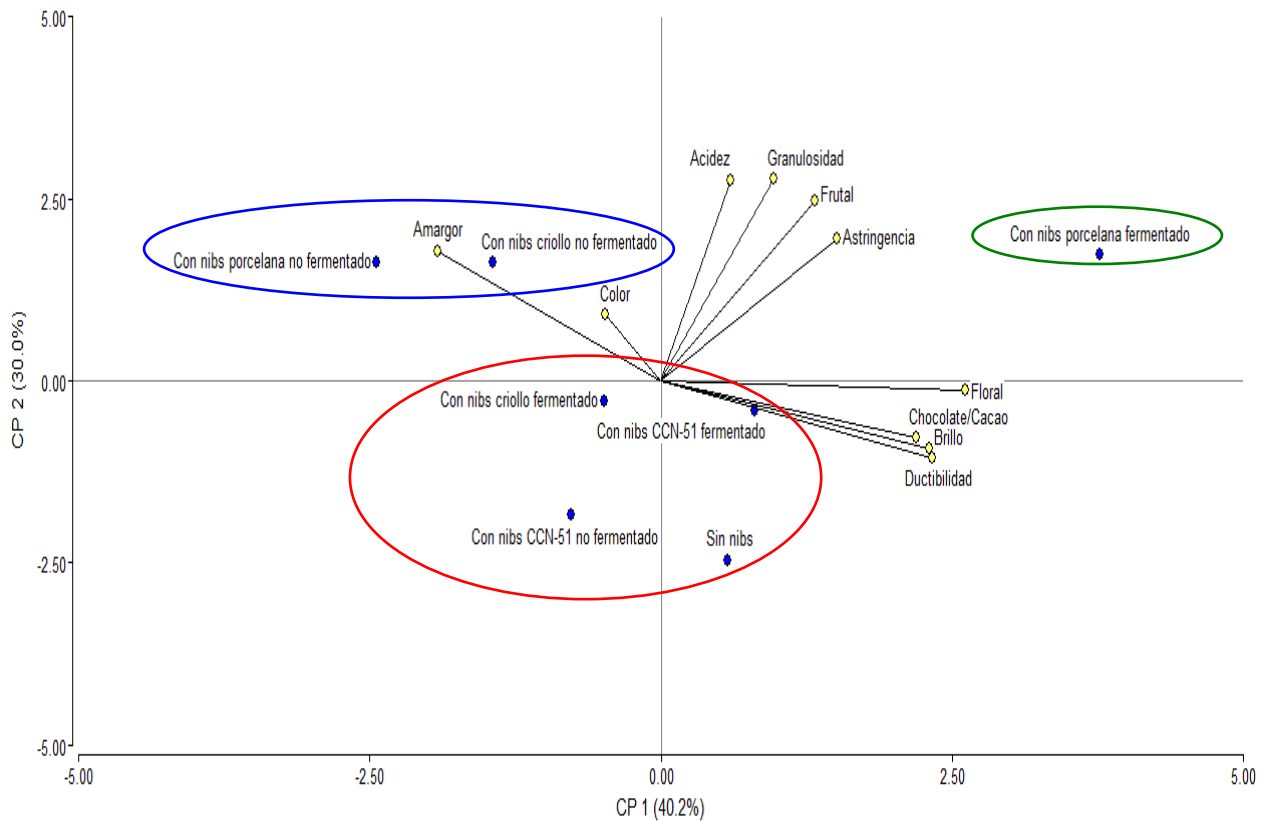


Figura 20. Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial en chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

Realizando el análisis estadístico mediante conglomerados de los tratamientos evaluados podemos diferenciar tres grupos (Figura 21); el primer grupo representa el 57,1% (sin nibs, con nibs CCN-51 no fermentado, con nibs criollo fermentado y con nibs CCN-51 fermentado); el segundo grupo representa el 28,6% (con nibs porcelana no fermentado y con nibs criollo no fermentado) y el tercer grupo representa el 14,3% (con nibs porcelana

fermentado), como se puede apreciar existe diferencia entre cada muestra con nibs fermentados y no fermentados.

Con respecto a los grupos formados se puede decir que el **primer grupo** está conformado por los tratamientos T1 (sin nibs), T3 (con nibs CCN-51 fermentado), T4 (con nibs criollo fermentado) y T6 (con nibs CCN-51 no fermentado) cuyos calificativos fueron los valores más altos en los atributos de color “inteso”, brillo “intenso”, aroma y sabor chocolate/cacao “intenso”, amargor “moderado”, acidez “moderado”, astringencia “leve-moderado” y ductibilidad “moderado” y el menor valor fueron para el aroma y sabor frutal, aroma y sabor floral y granulosis, los atributos desarrollados en los chocolates de este grupo fueron mejor que los dos grupos restantes, NAZARUDDIN *et al.* (2001) menciona que la oxidación de los compuestos polifenólicos en los granos de cacao fermentado afecta el color y sabor en el chocolate, según 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 y FERNÁNDEZ *et al.* (2014) indica que los polifenoles, no solo determinan importantes propiedades organolépticas del chocolate como el amargor final. La variedad CCN-51 tiene un buen nivel de sabor a cacao, ya que todos los cacaos tipo forastero y trinitario tienen este sabor típico (SÁNCHEZ, 2007).

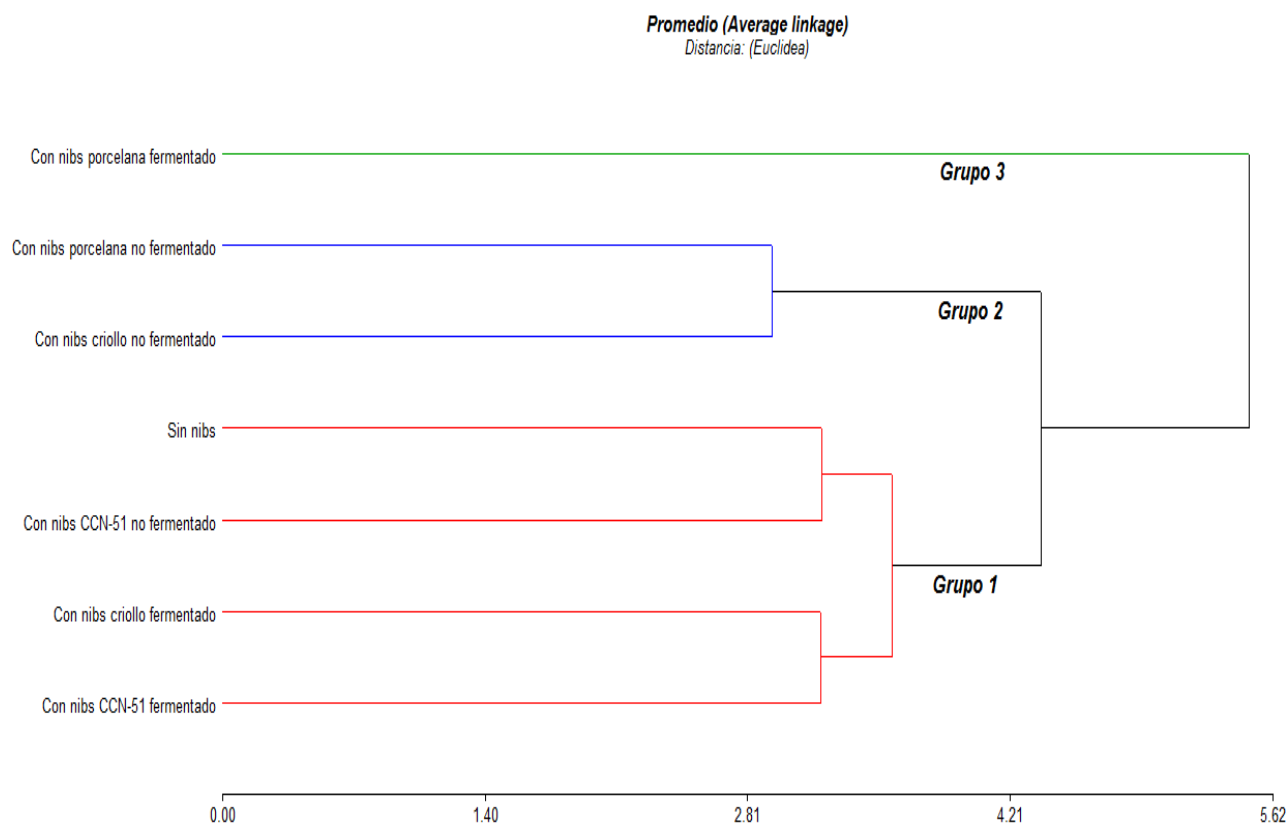


Figura 21. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de chocolate bitter con nibs fermentados y no fermentados.

El **segundo grupo** está conformado por los tratamientos T5 (con nibs porcelana no fermentado) y T7 (con nibs criollo no fermentados), en ellos encontramos que poseen los atributos color “intenso”, brillo “moderado”, aroma y sabor chocolate/cacao “moderado”, amargor “intenso”, acidez “moderado”, astringencia “moderado” y ductibilidad “moderado” y el menor calificativo fue para el aroma y sabor frutal, aroma y sabor floral y granulosidad, de los resultados podemos indicar que la concentración de antocianinas se reduce en un 90% durante la fermentación tanto para cacaos finos como para otros cacaos, las concentraciones más bajas se observaron en el día 2 y 3

respectivamente (NAZARIO, 2014). El aroma de las almendras frescas del cacao es poco desarrollado, tanto cuantitativamente como cualitativamente, el estireno (68%) y el dimetil formaldehído (8,5%) son los compuestos principales de la almendra fresca, bajos contenidos de alcoholes, aldehídos y cetonas también han sido puestos en evidencia (PORTILLO *et al.*, 2009). Según NAZARUDDIN *et al.* (2006) el grano de cacao contiene 12 – 18% de polifenoles las cuales están asociados con el sabor y color a chocolate.

El **tercer grupo** esta conformado por el tratamiento T2 (con nibs porcelana fermentado) cuyo valor calificativo fueron para color “intenso”, brillo “intenso”, aroma y sabor chocolate/cacao “intenso”, aroma y sabor frutal “moderado”, amargor “moderado”, acidez “moderado”, astringencia “moderado” y ductibilidad “moderado”, el menor valor lo tuvieron el aroma y sabor floral y granulosidad, de estos resultados podemos indicar que un adecuado proceso de fermentación y secado juega un papel importante en el desarrollo de los precursores del sabor deseable (KOWALSKA y SIDORCZUK, 2007). Según ZAPATA *et al.* (2013) en la fermentación aeróbica se forman los pigmentos marrones de los granos constituidos por polifenoles, epicatequina y catequina las cuales se oxidan a quinonas, y la condensación de las proteínas y polifenoles causan una reducción de la astringencia y sabor amargo. Tiene cotiledones pardos, se caracteriza por la amargura leve (pero no desagradable), astringencia leve y finos aromas (REYES, 2011).

V. CONCLUSIONES

- El mayor contenido de polifenoles totales se encontró en los chocolates bitter con inclusión de nibs no fermentados de cacao CCN-51, porcelana y criollo y el menor correspondió a los nibs fermentados.
- En los chocolates bitter con inclusión de nibs no fermentados de cacao CCN-51 y criollo tuvieron el mayor contenido de antocianinas y el menor lo tuvieron los nibs fermentados y el chocolate con nibs de porcelana no fermentado.
- La capacidad antioxidante frente al radical DPPH (IC_{50} 0,172 a 0,245 mg/mL) tuvo el siguiente orden: chocolates bitter con inclusión de nibs CCN-51, criollo y porcelana no fermentados > que con nibs porcelana y CCN-51 fermentado > que sin nibs > que con nibs criollo fermentado.
- La mayor capacidad frente al radical ABTS⁰⁺ (IC_{50} 0,053 a 0,075 mg/mL) tuvo el siguiente orden: chocolates bitter con inclusión de nibs no fermentados CCN-51, criollo y porcelana > que con nibs CCN-51, criollo y porcelana fermentado > que sin nibs.
- De la evaluación sensorial considerando 10 atributos, los mejores fueron los chocolates con nibs de CCN-51 fermentado y no fermentado, y criollo fermentado.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de vida útil en los chocolates bitter de 60% con inclusión de nibs no fermentados.
- Realizar un estudio de las características físicas (dureza, color y estabilidad de la grasa) del chocolate.
- Realizar un estudio sobre la determinación de las propiedades de textura de los chocolates mediante técnicas instrumentales.
- Si se desea un chocolate funcional y con buenas características sensoriales se recomienda elaborar un chocolate bitter 60% con nibs CCN-51 fermentado o no fermentado.
- Para un chocolate con buenas características sensoriales se recomienda utilizar nibs fermentados pero si prefiere que sea funcional debe incluir nibs no fermentados.

VII. ABSTRACT

The objective of the work was: to determinate the total polyphenols, anthocyanins, and the antioxidant capacity (DPPH and ABTS⁰⁺) and to do a sensory evaluation of chocolate bitter with fermented and unfermented cacao nibs. The chocolates produced contained 7% fermented and unfermented cacao nibs of the CCN-51, porcelana and criollo varieties. A hydro alcoholic extract was prepared of a 3 g sample (defatted) in 30 mL (50:50 v/v); macerated for twenty four hours, filtered and centrifuged (10000 rpm/10min/4°C). The results were analyzed using a completely randomized design (CRD) and the Tukey test ($p < 0.05$); a quantitative descriptive analysis (QDA) and multivariate principal component analysis (PCA) were used for the sensory evaluation. The chocolates with CCN-51, percelana and criollo unfermented cacao nibs presented the greatest content of total polyphenols and the chocolates without nibs and with fermented nibs, the lowest. The unfermented CCN-51 and croillo cacao nibs showed the greatest content of anthocyanins. The greatest antioxidant capacity against the DPPH and ABTS⁰⁺ radicals was found in the chocolates with unfermented CCN-51, criollo and porcelana nibs (IC_{50} 0.172±0.002, 0.189±0.004, 0.196±0.004 and 0.053±0.002, 0.054±0.002, 0.055±0.002 mg/mL, respectively). Three groups were found in the sensory evaluation: in the first group (the fermented CCN-51 and criollo and

unfermented CCN-51 nibs), predominated all the attributes; in the second (the unfermented criollo and porcelana nibs), high bitterness content was jumped out; and in the third (the fermented porcelana nibs), was predominated the astringency and floral aroma predominated.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBE, M., ISMAIL, A. 2010. Antioxidant properties of cocoa powder. *Journal of Food Biochemistry, Malaysia*. 34: 111–128.
- ADRIAZOLA, J. 2003. Producción del alimento de los Dioses *Theobroma cacao* L. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María (Perú). Monografía. 81 p.
- AFOAKWA, E. 2010. *Chocolate science and technology*. New Dheli, India, Wiley-Blackwell. 296 p.
- AIKPOKPODION, P., DONGO, L. 2010. Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. *International Journal of Sustainable Crop Production, Nigeria*. 5(4): 66–70.
- ALVIS, A., PÉREZ, L., ARRAZOLA, G. 2011. Determinación de las propiedades de textura de tabletas de chocolate mediante técnicas instrumentales. *Información Tecnológica, Colombia*. 22(3): 11–18.
- AQUINO, R., DE SIMONE, F., PIZZA, C., CONTI, C., STEIN, M. 1989. Plants metabolites, structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products, United States*. 52(4): 679–685.

- ARLORIO, M., LOCATELLI, M., TRAVAGLIA, F., COÏSON, J., DEL GROSSO, E., MINASSI, A., APPENDINO, G., MARTELLI, A. 2008. Roasting impact on the contents of clovamide (*N*-caffeoyl)-*L*-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, United States. 106(3): 967–975.
- ARMIJOS, A. 2002. Caracterización 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. Químico. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica. 103 p.
- BACELAR, P., DA SILVA, E., RADOMILLE, L. 2013. Sensory profiles of chocolates produced from cocoa cultivars resistant to *Moniliophthora Perniciosa*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. 35(2): 594–602.
- BECKETT, S. 1994. Fabricación y utilización industrial del chocolate. Zaragoza, España, Acribia. 440 p.
- BECKETT, S. 2002. La ciencia del chocolate. Zaragoza, España, Acribia. 216 p.
- BELSCAK, A., KOMES, D., HORZIC, D., KOVACEVIC, K., KARLOVIC, D. 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, Croatia. 42: 707–716.
- BRAND, W., CUVELIER, M., BERSET, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, Canada. 28: 25–30.

- CADENA, T., HERRERA, Y. 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. 91 p.
- CALDERÓN, L. 2002. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao* L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad. Tesis Lic. Químico. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 114 p.
- CASIQUE, C. 2014. Determinación del contenido de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante en alimentos preparados con licor y polvo de cacao. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 104 p.
- CHACÓN, I., RAMIS, C., GÓMEZ, S. 2011. Descripción morfológica de frutos y semillas del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Revista de la Facultad de Agronomía, Venezuela. 28(1): 1–13.
- CHAVEZ, R. 2012. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 80 p.
- CHIA, J. 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS – Tingo María. Tesis Mag. Biología Molecular. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 136 p.

- COCHRAN, W., COX, G. 1995. Diseños experimentales. 2 Ed. D.F., México, Trillas. 661 p.
- CODEX STAN 87-191. 2003. Norma para el chocolate y los productos del chocolate. [En línea]: (<http://www.ipffsaph.org/cdsupload%5Ckopopdata%5Ccodex0%5Cescxs1415.pdf>, documento, 18 May. 2014).
- DÍAZ, S., PINOARGOTE, M. 2012. Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas. Tesis Ing. Alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela Superior Politécnico del Litoral. 145 p.
- EFRAIM, P., BARRETO, A., PEREIRA, D. 2011. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variacao e efeitos na saúde. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas. 14(3): 181–201.
- EFRAIM, P., PEZOA, N., PEREIRA, D., NISHIKAWA, A., HADDAD, R., NOGUEIRA, M. 2010. Influencia da fermentacao e secagem de amendoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitacao sensorial. Ciencia e Tecnología de Alimentos, Campinas. 30: 142–150.
- FENGLIN, G., LEHE, T., HUASONG, W., YIMING, F., FEI, X., ZHONG C., QINGHUANG, W. 2013. Comparison of cocoa beans from China, Indonesia and Papua New Guinea. Foods, China. 2: 183–197.
- FERNÁNDEZ, V., YEE, A., SULBARÁN, B., PEÑA, J. 2014. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en chocolates comerciales

- venezolanos. Revista de la Facultad de Agronomía, Venezuela. 31: 129–144.
- FOTI, M., DAQUINO, C., CORRADA, G. 2004. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions. Journal of Organic Chemistry, Europe. 69: 2309–2314.
- FRANCO, T., HIDALGO, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali (Colombia). Boletín Técnico nº 8. 94 p.
- GARCÍA, F. 2011. La cultura del chocolate. [En línea]: (<http://www.um.es/lafem/Actividades/CursoBiologia/MaterialAyuda/2011-03-22-Paco.pdf>, documento, 30 Ago. 2014).
- GARCÍA, L. 2010. Cultivares de cacao del Perú. Ministerio de Agricultura y DEVIDA. Lima (Perú). Catálogo. 112 p.
- GIL, J. 2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis MSc. Farmacéuticas. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. 119 p.
- GONZÁLES, Y., PÉREZ, E., PALOMINO, C. 2012. Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. Actualización en Nutrición, Venezuela. 13(4): 314–331.
- GUTIÉRREZ, B. 2002. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. Acta Farmacéutica Bonaerense, Cuba. 21(2): 149–152.

- HERNANDEZ, E. 2010. Tecnología del cacao. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Sogamoso (Colombia). Monografía. 170 p.
- HERNÁNDEZ, R., FERNÁNDEZ, C., BAPTISTA, P. 2006. Metodología de la investigación. 4 Ed. D.F., México, McGraw-Hill Interamericana. 839 p.
- 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. 80 p.
- HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, United States. 58: 1841–1856.
- JARRÍN, N. 2010. Diseño y desarrollo de un plan de buenas prácticas de manufactura para una empresa de elaboración de confites en el área de chocolates. Tesis Ing. Químico. Quito, Ecuador. Escuela Politécnica Nacional. 112 p.
- KOWALSKA, J., SIDORCZUK, A. 2007. Analysis of the effect of technological processing on changes in antioxidant properties of cocoa processed products. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, Poland. 57(2): 95–99.
- KUSKOSKI, E., ASUERO, A., GARCÍA, M., TRONCOSO, A., FETT, R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, Brasil. 24(4): 691–693.
- LA CATALANA. 2011. Chocolatería Premium: Tips para degustar el chocolate como los expertos. [En línea]:

- (<http://www.lacatalanachocolaterias.com/Degusta%20el%20chocolate%20como%20los%20expertos%20LA%20CATALANA.pdf>, documento, 30 Ago. 2014).
- LIENDO, R. 2005. Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos. [En línea]: INIA, (<http://www.indacoperu.com/pdf/EI%20Chocolate.pdf>, documento, 25 Ago. 2014).
- LUNA, F., CROUZILLAT, D., CIROU, L., BUCHELI, P. 2002. Chemical composition and flavor of ecuadorian cocoa liquor. *Journal Agricultural and Food Chemistry, United States*. 50(12): 3527–3532.
- MÁRQUEZ, 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. Biología. Mérida, Venezuela. Universidad de los Andes. 98 p.
- MARTÍNEZ, I., PERIAGO, M., ROS, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. ALAN, Caracas. 50: 5–18.
- MENDIBURU, F. 2005. Diseños experimentales. [En línea]: ([http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu/index-filer/academic/Foresteria%20II/Teoría/Exp Model.pdf](http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu/index-filer/academic/Foresteria%20II/Teoría/Exp%20Model.pdf), documento, 15 Mar. 2015).
- MILLER, K., STUART, D., SMITH, N., LEE, C., MCHALE, N., FLANAGAN, J., OU, B., HURST, W. 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Massachusetts*. 54(11): 4062–4068.

- MISNAWI, J., JAMILAH, B., NAZAMID, S. 2002. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture, United States*. 82; 559–566.
- NAVIA, A., PAZMIÑO, N. 2012. Mejoramiento de las características sensoriales del cacao CCN51 a través de la adición de enzimas durante el proceso de fermentación. Tesis Ing. Alimentos. Guayaquil, Ecuador. Escuela superior politécnica del litoral. 135 p.
- NAZARIO, O. 2014. Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante en granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 108 p.
- NAZARUDDIN, R., AYUB, Y., MAMOT, S., HENG, H. 2001. HPLC determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. *Malaysian Journal of Analytical Sciences, Malaysia*. 7(2): 377–386.
- NAZARUDDIN, R., OSMAN, H., MAMOT, S., WAHID, S., NOR, A. 2006. Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation, Malaysia*. 30: 280–298.
- NIEMENAK, N., ROHSIUS, C., ELWERS, S., OMOKOLO, D., LIEBEREI, E. 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis, Germany*. 19: 612–619.

- NTP-ISO 2291. 2006. Granos de cacao – Determinación del contenido de humedad (Método de rutina). 2 Ed. Lima, Perú, INDECOPI. 6 p.
- NÚÑEZ, C. 2008. Extracciones con equipo soxhlet. [En línea]: (<http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequipo Soxhlet.pdf>, documento, 20 Jul. 2015).
- OLIVERAS, J. 2007. La elaboración del chocolate, una técnica dulce y ecológica. [En línea]: (<http://www.tecnica industrial.es/tiadmin/numeros/28/37/a37.pdf>, documento, 25 Ago. 2014).
- ORDOÑEZ, E., VARGAS, E., LEÓN, A. 2012. Polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en chocolates comerciales para taza. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María (Perú). Informe de investigación. 8 p.
- OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N., ADENAN, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chemistry, United States. 100: 1523–1530.
- PADILLA, F., RINCÓN, A., BOU, L. 2008. Contenido de polifenoles y antioxidante de varias semillas y nueces. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Venezuela. 58(3): 303–308.
- PALACIOS, A. 2008. Establecimientos para parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (*Theobroma cacao* L.) producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriana. Tesis Ing. Agrónomo. Manabí, Ecuador. Universidad Técnica de Manabí. 257 p.

- PEREA, J., CADENA, T., HERRERA, J. 2009. El cacao y sus productos como fuente de antioxidante: Efecto del procesamiento. Salud UIS, Santander. 41: 128–134.
- PORTILLO, A. 2012. Efecto del tratamiento poscosecha sobre el desarrollo de las características fisicoquímicas del cacao criollo porcelana del estado Zulia. Tesis Mg. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Maracaibo, Venezuela. 91 p.
- PORTILLO, E., GRAZIANI, L., BETANCOURT, E. 2007. Análisis químico del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. Revista de la Facultad de Agronomía, Venezuela. 24(3): 522–546.
- PORTILLO, E., GRAZIANI, L., CROS, E. 2006. Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). Revista de la Facultad de Agronomía, Venezuela. 23: 51–59.
- PORTILLO, E., LABARCA, M., GRAZZIANI, L., CROS, E., ASSEMAT, S., DAVRIEUX, F., BOULANGER, N. 2011. Influencia de las condiciones del tratamiento poscosecha sobre la temperatura y acidez en granos de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.). Revista de la Facultad Agronomía, Venezuela. 28(1): 646–660.
- PORTILLO, E., LABARCA, M., GRAZZIANI, L., CROS, E., ASSEMAT, S., DAVRIEUX, F., BOULANGER, R., MARCANO, M. 2009. Formación del aroma del cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento

- poscosecha en Venezuela. Revista UDO Agrícola, Venezuela. 9(2): 458–468.
- RADOJCIC, I., DELONGA, K., MAZOR, S., DRAGOVIC, V., CARIC, M., VORKAPIC, J. 2009. Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. Czech Journal of Food Sciences, Croatia. 27(5): 330–337.
- RAMÍREZ, E. 2011. Reingeniería del proceso productivo de chocolate en barra en una industria alimentaria. Tesis Ing. Químico. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 207 p.
- RAMOS, G. 2007. Programa de formación de catadores de cacao intermedios y avanzados y talleres de capacitación a personal de asociaciones de productores. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo y Unión Europea. Lima (Perú). Informe final. 27 p.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, United Kingdom. 26(9/10): 1231–1237.
- REQUENA, J. 2012. El cacao y sus derivados. [En línea:] (http://www.csi-f.es/archivos/andalucia/ensenanza/revistas/iee/Numero_56/JOSE_REQ_UENA_1.pdf, documento, 13 Jun. 2015).
- REYES, F. 2011. Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante y evaluación sensorial en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y CCN-51 con y sin beneficio. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 103 p.

- RIERA, M. 2009. Evaluación de tecnologías para la fermentación del cacao beneficiado CCN-51 (*Theobroma cacao* L.). Tesis Ing. Agroindustrial. Puyo, Ecuador. Universidad Estatal Amazónica. 91 p.
- RODRÍGUEZ, J. 2011. Estudio de los compuestos volátiles de *Theobroma cacao* L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado. Tesis Doctoral Ciencias en Alimentos. D.F., México. Instituto Politécnico Nacional. 188 p.
- SÁNCHEZ, V. 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. 93 p.
- SANDOVAL, M., OKUHAMA, N., ANGELES, F., MELCHOR, V., CONDEZO, L., LAO, J., MILLER, M. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry, United States. 79: 207–213.
- STAHL, L., MILLER, K., APGAR, J., SWEIGART, D., STUART, D., MCHALE, N., OU, B., KONDO, M., HURST, W. 2009. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. Journal of Food Science, United States. 74(6): 456–461.
- SULISTYOWATI, E., MISNAWI, J. 2008. Effects of alkali concentration and conching temperatura on antioxidant activity and physical properties of chocolate. International Food Research Journal, United States. 15(3): 297–304.

- TOMÁS, F. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, Nutrición y Salud, Murcia. 10(2): 41–53.
- TORRES, M. 2012. Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro. Tesis Doctoral. Tarragona, España. Universitat Rovira I Virgili. 246 p.
- WAKAO, H. 2002. Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio. Tesis Lic. Ciencia Químicas. Quito, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 91 p.
- WALKER, S. 2013. Cocoa & chocolate. Archer Daniels Midland Company. Suiza (Europa). Manual. 172 p.
- WILBUR COMPANY. 2010. Sensory analysis of chocolate. [En línea:] (www.wilderchocolate.com, documento, 16 Jun. 2014).
- WOLLGAST, J. 2004. The contents and effects of polyphenols in chocolate qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health. Tesis Doctoral. Giessen, Alemania. Justus Liebig University Giessen. 349 p.
- XI, J., SHEN, D., LI, Y., ZHANG, R. 2011. Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods. International Journal of Pharmaceutics, China. 408: 97–101.

- ZAPATA, L., HEREDIA, A., QUINTEROS, C., MALLERET, A., CLEMENTE, G., CÁRCEL, J. 2014. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología, Argentina*. 25(49): 166–192.
- ZAPATA, S., TAMAYO, A., ALBERTO, B. 2013. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales, Cuba*. 18(3): 391–404.

IX. ANEXOS

A-I: Procedimiento para la determinación de la curva estándar.

La curva estándar se preparó realizando una solución stock de 10 mL de ácido gálico a una concentración de 1 mg/mL a partir de ello se hicieron las concentraciones siguientes: 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,05 y 0,01 mg/mL cada solución se preparó por triplicado. En cada tubo se agregó 1580 μ L de agua desionizada y 20 μ L de muestra control y estándares, se homogenizo ligeramente, luego se adicionó 100 μ L de solución fenol folin ciocalteu, se incubo por 1 min a temperatura ambiente; se neutralizó la reacción agregando 300 μ L de Na_2CO_3 al 20% y finalmente se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Luego se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm, con los resultados obtenidos se graficó la concentración vs absorbancia, luego se procedió a determinar la ecuación y el coeficiente de correlación.

A-III: Distribución de los tratamientos para la evaluación sensorial.

Panelistas	Tratamientos						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	X	X					
2		X				X	
3			X	X			
4				X			X
5	X				X		
6					X	X	
7			X				X
8	X		X				
9		X		X			
10			X		X		
11				X		X	
12					X		X
13	X					X	
14		X					X
15	X			X			
16		X	X				
17			X			X	
18				X	X		
19		X			X		
20						X	X
21	X						X

A-IV: Resultados de las absorbancias de la curva estándar de polifenoles.

Concentraciones (mg EAG/mL)	Absorbancias (700 nm)			Promedio
	R ₁	R ₂	R ₃	
0,80	0,882	0,935	0,814	0,877
0,60	0,654	0,648	0,718	0,673
0,40	0,444	0,485	0,449	0,459
0,20	0,238	0,201	0,222	0,220
0,10	0,121	0,122	0,105	0,116
0,05	0,053	0,056	0,080	0,063
0,01	0,012	0,014	0,016	0,014

A-V: Análisis de varianza de contenido de polifenoles totales en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F cal.	P _{valor}	Sig.
Tratamientos	6	1,5148	0,2525	31,08	<0,0001	**
Error experimental	14	0,1137	0,0081			
Total	20	1,6285				
R ² = 0,9302		C.V. = 3,6276		M.S.E. = 0,0901		Media = 2,4847

A-VI: Análisis de varianza de contenido de antocianinas en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F cal.	P_{valor}	Sig.
Tratamientos	6	0,0089	0,0015	76,18	<0,0001	**
Error experimental	14	0,0003	0,0000			
Total	20	0,0092				
<hr/>						
$R^2 = 0,9703$	C.V. = 11,3021		M.S.E. = 0,0044		Media = 0,0391	

A-VII: Análisis de varianza de IC₅₀ del radical DPPH en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F cal.	P_{valor}	Sig.
Tratamientos	6	0,0156	0,0026	12,52	<0,0001	**
Error experimental	14	0,0029	0,0002			
Total	20	0,0185				
<hr/>						
$R^2 = 0,8429$	C.V. = 6,6550		M.S.E. = 0,0144		Media = 0,2162	

A-VIII: Análisis de varianza de IC₅₀ del radical ABTS⁰⁺ en chocolate bitter de 60% con nibs fermentados y no fermentados.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F cal.	P_{valor}	Sig.
Tratamientos	6	0,0015	0,0003	13,12	<0,0001	**
Error experimental	14	0,0003	0,0000			
Total	20	0,0018				
<hr/>						
R ² = 0,8490	C.V. = 7,0230	M.S.E. = 0,0044	Media = 0,0628			

A-IX: Análisis de componentes principales de los atributos del chocolate – matriz de correlación/coeficientes.

Variables	Color	Brillo	Chocolate/ Cacao	Frutal	Floral	Amargor	Acidez	Astringencia	Ductibilidad	Granulosidad
Color	1,00									
Brillo	0,01	1,00								
Chocolate/Cacao	0,26	0,71	1,00							
Frutal	4,4E ⁻⁰³	-0,01	0,19	1,00						
Floral	-0,26	0,76	0,72	0,33	1,00					
Amargor	0,14	-0,61	-0,82	-0,07	-0,56	1,00				
Acidez	0,12	-0,02	-0,08	0,70	0,22	0,31	1,00			
Astringencia	0,03	0,42	0,09	0,65	0,37	0,08	0,52	1,00		
Ductibilidad	-0,62	0,72	0,48	0,17	0,81	-0,63	-0,11	0,37	1,00	
Granulosidad	0,25	-0,05	0,18	0,81	0,36	0,23	0,69	0,57	-0,03	1,00

A-X: Análisis de componentes principales de los atributos del chocolate – correlaciones con las variables originales.

Variables	CP1	CP2
Color	-0,17	0,28
Brillo	0,82	-0,29
Chocolate/Cacao	0,78	-0,24
Frutal	0,47	0,76
Floral	0,93	-0,04
Amargor	-0,68	0,55
Acidez	0,21	0,84
Astringencia	0,54	0,60
Ductibilidad	0,83	-0,32
Granulosidad	0,34	0,85

Correlación cofenética = 0,955