

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO DE
POLIFENOLES EN GRANO, CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE SU
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES DE CACAO REGIONALES DE
NARIÑO**

CAROL ANDREA IBARRA CABRERA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2018**

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDO DE
POLIFENOLES EN GRANO, CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE SU
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES DE CACAO REGIONALES DE
NARIÑO**

CAROL ANDREA IBARRA CABRERA

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Director

**JONNY ARIEL FAJARDO
QUIMICO INVESTIGADOR CIAD.**

Co- Director

**M.Sc. JUAN CAMILO VARGAS
QUIMICO INDUSTRIAL Ms.C**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2018**

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1ro del Acuerdo N°. 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Jony Ariel Fajardo Daza
Director

David Arturo Perdomo
Jurado

Johanna Catalina Rosero Rosero
Jurado

San Juan de Pasto, 31 de agosto de 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial y sincera a mi director de tesis, el Químico Jonny Ariel Fajardo Daza, por aceptarme para realizar mi trabajo de grado en su proyecto de investigación y así terminar mis estudios profesionales bajo su dirección; su apoyo y confianza fue un aporte muy invaluable en mi formación y práctica en el laboratorio.

Quiero extender mi agradecimiento al M.Sc. Juan Camilo Vargas como co-director de éste trabajo de grado por su disponibilidad y amplio conocimiento además por sus respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo, lo cual se ha visto también reflejado en los buenos resultados obtenidos.

A la Corporación de Investigación Aplicada al Desarrollo y a todos sus integrantes, en donde logré desarrollar mi práctica empresarial para poder terminar con satisfacción mis sueños académicos y profesionales.

RESUMEN

En el presente trabajo se optimizó el proceso de extracción de compuestos fenólicos presentes en el grano de cacao, evaluando el efecto del tipo de solvente, temperatura, tiempo de extracción y la relación soluto/solvente, utilizando la técnica de ultrasonido; en una primera fase se determinó el solvente más adecuado para la extracción de compuestos fenolicos mediante un diseño irrestrictamente al azar usando cinco (5) solventes y dos réplicas, encontrando que la mezcla Acetona:Agua:Ácido Acético (70:29,5:0,5) extrae la mayor cantidad de fenoles totales medidos por el método de Folin-Ciocalteu. En la segunda fase se usó un diseño central compuesto 2^2 + estrella con dos puntos centrales, evaluándose mediante la metodología de superficie de respuesta para determinar la influencia de los factores temperatura, tiempo y relación soluto/solvente. En todos los casos se midió el contenido de fenoles totales empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu a 760nm. Los resultados experimentales utilizando el ANOVA, mostraron que se obtuvieron seis (6) efectos significativos que influyen sobre la variable de respuesta (fenoles totales) influenciada por los efectos principales de los tres factores y tres de sus interacciones. El mayor rendimiento se alcanzó bajo las siguientes condiciones optimizadas: 39,3 °C, 74,5 minutos y 22,8 mL de solvente por gramo de muestra de cacao. De igual manera se realizó la determinación de la línea base del contenido inicial de fenoles totales y capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH para cinco (5) materiales regionales del Consejo Comunitario Rescate Las Varas en Tumaco. Estos tres métodos analíticos fueron implementados y verificados estadísticamente.

PALABRAS CLAVE: optimización, ultrasonido, compuestos fenólicos, cacao, materiales regionales, Nariño

ABSTRACT

In this work was carried out the optimization of extraction process of phenolic compounds presents in cocoa bean, evaluating the effect of type of solvent, temperature, extraction time and solute/solvent ratio, using the ultrasound technique; for this purpose, in a initial phase, the most adequate solvent for polyphenols extraction was determined by an random unrestricted design using five (5) solvents and two replicates, finding that the Acetone: Water: Acetic acid (70: 29.5: 0.5) mixture, extracts the greatest amount of total phenols, measured by the Folin-Ciocalteu method. In the second phase a factorial 2^2 composite central design + two central points was used, evaluated by the response surface methodology to determine the influence of the factors: Temperature, time and solute/solvent ratio. In all cases, the polyphenol content was measured using the Folin-Ciocalteu reagent at 760 nm. The experimental results using the ANOVA, showed six (6) significant effects that influence the response variable (total phenols), affected by the main effects of the three factors and three of their interactions. The highest yield was achieved under the following optimized conditions: 39.3 ° C of temperature, 74.5 minutes and 22.8 mL of solvent per gram of cocoa sample. Likewise, the determination of the baseline of total polyphenols initial content and antioxidant capacity was made by the ABTS and DPPH methods for five (5) regional materials of the Community Council Rescate Las Varas, in Tumaco. These three analytical methods were implemented and verified statistically.

KEY WORDS: optimization, ultrasound, polyphenols, cocoa, regional materials, Nariño.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCION	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
1.2.1. Implementar los métodos analíticos para la determinación de polifenoles totales (método Folin-Ciocalteu) y capacidad antioxidante (métodos DPPH y ABTS).....	18
1.2.2. Evaluar los factores que intervienen en el proceso de extracción por ultrasonido de polifenoles en granos de cacao, para determinar los niveles óptimos de dichos factores.	18
1.2.3. Cuantificar los polifenoles totales presentes en el grano de cacao Nariñense, por el método Folin-Ciocalteu.	18
1.2.4. Determinar la capacidad antioxidante (métodos DPPH y ABTS) en materiales de cacao regionales del departamento de Nariño.	18
2. ESTADO DEL ARTE.....	19
2.1. EL CACAO	19
2.1.1. Generalidades.....	19
2.1.2. Diversidad de Cacao.....	19
2.1.3. Composición química del cacao	19
2.1.4. El cacao en la economía.....	20
2.1.5. Propiedades para la salud del cacao.....	21
2.2. FENOLES	21
2.2.1. Polifenoles.....	21
2.2.2. Tipos de fenoles.....	22
2.2.3. Clasificación de los compuestos fenólicos	24
2.2.4. Propiedades de los compuestos fenólicos.....	25
2.3. COMPUESTOS FENOLICOS EN LAS PLANTAS	25
2.3.1. Fenoles en cacao.....	26
2.4. EFECTO DEL PROCESAMIENTO DEL CACAO EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS	29
2.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	30
2.5.1. RELACIÓN ESTRUCTURA - ACTIVIDAD.....	30
2.6 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	31
2.6.1. Método ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).....	32
2.6.2. Método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)	33
2.6.3. Método Folin Ciocalteu	34

2.7. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE FENOLES	34
2.8. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	35
2.8.1. Elección de las variables	35
2.9. VERIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	39
3.2 REACTIVOS Y EQUIPOS.....	39
3.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	39
3.3.1. Desengrasado.....	39
3.2.2 Extracción	40
3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE FENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	40
3.3.1 Método de Folin-Ciocalteu para fenoles totales	40
3.3.2 Actividad atrapadora del radical libre DPPH.....	40
3.3.3 Actividad inhibitoria del catión-radical ABTS•+	41
3.4 VERIFICACION DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	41
3.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS....	42
3.6. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES REGIONALES DE CACAO	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA MATERIA PRIMA.....	44
4.2 IMPLEMENTACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES (MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU) Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (MÉTODOS DPPH Y ABTS).....	44
4.3 VERIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	45
4.4 OPTIMIZACIÓN DE LOS FACTORES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES POR ULTRASONIDO	47
4.4.1 SELECCIÓN DEL SOLVENTE	47
4.4.2 NIVELES ÓPTIMOS DE TEMPERATURA, TIEMPO Y RELACIÓN SOLUTO SOLVENTE.....	48
4.5 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES PRESENTES EN EL GRANO DE CACAO NARIÑENSE Y DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	54
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	58
ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Composición química del cacao.....	20
Tabla 2. Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según la reacción ET o HAT	31
Tabla 3. Factores y niveles del proceso de extracción de fenoles	42
Tabla 4. Análisis bromatológico	44
Tabla 5. Preparación de muestra desengrasado vs sin desengrasar	45
Tabla 6. Análisis de varianza desengrasado vs sin desengrasar	45
Tabla 7. Parámetros estadísticos verificación	46
Tabla 8. Prueba de Tukey para tipo de solvente	48
Tabla 9. Análisis de Varianza para Diseño compuesto central	49
Tabla 10. Valores óptimos.....	53
Tabla 11. Fenoles totales en material vegetal y capacidad antioxidante por ABTS y DPPH.	54

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estructura de los fenoles.....	22
Figura 2. Clasificación de los Taninos (Khnbabae, et al 2001).	23
Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.....	24
Figura 4. Ruta del acetato-malonato y ruta ácido shikímico.....	26
Figura 5. Estructuras químicas de las procianidinas dimericas (enlace tipo B) B4 y B3.	28
Figura 6. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrogeno (Huan et al ,2005).....	31
Figura 7. Reacción de ABTS (Kuskoski 2004).	32
Figura 8. Reacción de DPPH (Ojha et al., 2012).....	33
Figura 9. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu. (Huang et, 2005)	34
Figura 10. Diagrama de Pareto Estandarizado para fenoles totales	50
Figura 11. Efectos principales para Fenoles totales.....	50
Figura 12. Interacciones para fenoles totales.....	51
Figura 13. Superficie de respuesta Temperatura vs. Tiempo.....	52
Figura 14. Superficie de respuesta Temperatura vs. Relación soluto/solvente.....	52
Figura 15. Superficie de respuesta Tiempo vs. relación soluto/solvente.....	53

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Datos de muestras centrifugadas vs. muestras sin centrifugar.....	65
Anexo B. Selectividad métodos abts, dpph y folin-ciocalteau	66
Anexo C. Linealidad y precision del sistema abts	67
Anexo D. Linealidad Y Precision Del Sistema Dpph	68
Anexo E. linealidad y precision del sistema folin-ciocalteau.....	69
Anexo F. Precisión Del Metodo Abts.....	70
Anexo G. Precisión Del Metodo Dpph.....	71
Anexo H. Precisión Del Metodo Folin-Ciocalteau.....	72
Anexo I. Tiempo De Reaccion Para Dpph.....	73
Anexo J. Tiempo De Reacción Para Abts	74
Anexo K. Tiempo De Reaccion Para Folin-Ciocalteau.....	75
Anexo L. Diagramas De Contorno Superficie De Respuesta	77
Anexo M. Datos de abts para materiales regionales, anova y prueba de tukey.....	78
Anexo N. Datos de dpph para materiales regionales, anova y prueba de tukey	79
Anexo O. Datos De Fenoles Totales Para Materiales Regionales, Anova Y Prueba De Tukey	80
Anexo P. Protocolo Metodo De Folin-Ciocalteau	81
Anexo Q. Protocolo Actividad Inhibitoria Del Radicar Abts	84
Anexo R. Protocolo Metodo 1,1-Difenil-2-Picril-Hidrazilo (Dpph)	88

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS	Acido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)
AG	Ácido Gálico
ANOVA	Análisis de Varianza
Da	Dalton
DDPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EAU	Extracción Asistida por Ultrasonido
ET	Electrón Transfer (Transferencia de electrones)
F-C	Folin-Ciocalteu
HAT	Hydrogen atom tranfer (Transferencia de átomos de hidrógeno)
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)
mM	milimolar
mmol	milimoles
R.S/S	soluto/solvente
rpm	revoluciones por minuto
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity (Capacidad Antioxidante en equivalentes Trolox)
Trolox	6-Hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
T	temperatura
t	tiempo
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

GLOSARIO

Antioxidante: El término antioxidante se le da a un grupo de moléculas que son capaces de retardar o impedir el efecto del oxígeno en otras lo cual recibe el nombre de oxidación la cual consiste en la transferencia de electrones de una sustancia a otras a partir de un agente oxidante lo que incurre en la liberación de radicales que ocasiona la muerte celular.

Antitrombótico: Los antitrombóticos son compuestos o medicamentos que reducen el riesgo de sufrir un ataque cardíaco, un accidente cerebrovascular y una obstrucción de las arterias y venas, ya que evitan que se formen coágulos de sangre (trombos) o que estos aumenten de tamaño.

Cavitación: Fenómeno de la mecánica de fluidos en el cual por acción de ondas sonoras en un líquido, se forman burbujas o cavidades que crecen y finalmente colapsan, produciendo una estela de gas de gran energía

Clon: El concepto de clon permite hacer referencia al grupo de organismos o células que son idénticos desde el punto de vista genético y que se originan a través de una reproducción de carácter asexual.

Línea base: El estudio de línea base es una investigación aplicada, realizada con la finalidad de describir la situación inicial de la población objetivo de un proyecto, así como del contexto pertinente, a efectos de que esta información pueda compararse con mediciones posteriores y de esta manera evaluar objetivamente la magnitud de los cambios logrados en virtud de la implementación de un proyecto.

Material vegetal regional: Grupo de plantas definido con precisión por la expresión de ciertos caracteres distintivos, seleccionado dentro de una misma especie vegetal por los agricultores y los cultivadores de una región; y que se han adaptado al entorno en que se cultivan y que se adecuan a las prácticas de cultivo utilizadas.

Metabolito secundario: Se llaman metabolitos secundarios de las plantas a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Optimización (matemática): Es la selección del mejor elemento, con respecto a algún criterio, de un conjunto de elementos disponibles. En el caso más simple, un problema de optimización consiste en maximizar o minimizar una función real eligiendo sistemáticamente valores de entrada (tomados de un conjunto permitido) y computando el valor de la función. De forma general, la optimización incluye el descubrimiento de los "mejores valores" de alguna función objetivo dado un dominio definido.

Sonicación: La sonicación es el proceso de convertir una señal eléctrica en una vibración física o energía sonora, que puede ser dirigida hacia una sustancia con el propósito de agitar las partículas en una muestra.

Superficie de respuesta: La Metodología de Superficies de Respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta.

Ultrasonido: Los ultrasonidos son sonidos cuya frecuencia es inaudible para el oído humano y de magnitud muy alta con frecuencias > 20 kHz. Constituye una manera barata, simple y eficaz de producir una disolución en muestras sólidas.

Valor agregado: Valor agregado o valor añadido es una característica o servicio extra que se le da a un producto o servicio, con el fin de darle un mayor valor comercial; generalmente se trata de una característica o servicio poco usado por los competidores y que aporta cierta diferenciación a un producto o empresa.

INTRODUCCION

El creciente interés en los últimos años por el poder antioxidante que es la capacidad de capturar radicales libres ha incentivado numerosas investigaciones, que han sido desarrolladas con el fin de determinar componentes naturales como los compuestos fenólicos presentes en las diferentes partes de las plantas (Quiñones et al., 2012.), los cuales son producidos en el metabolismo secundario de estas y presentan propiedades funcionales, no solo como antioxidantes, sino que también como anticancerígenos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimutagénicos, antibacteriales y analgésicos.

La planta *Theobroma cacao* L. es conocida debido a que sus semillas son utilizadas en la elaboración de diversos productos como: el chocolate, el cacao en polvo y la manteca de cacao, que son a su vez, materia prima para otros derivados utilizados en la industria cosmética y farmacéutica. El cacao es en particular rico en fenoles, estos representan entre 12 y 18 % del peso seco de los granos, se encuentran fuertemente asociados con la actividad antioxidante y con las características organolépticas de los productos elaborados como el amargor final (Zapata et al 2013).

El cacao producido en la región pácifica de Nariño, se reconoce de manera especial debido a sus cualidades particulares, caracterizándose por tener aromas con tonos frutales y florales, y buen sabor a chocolate (Casa Luker, 2011). El 76 % del cacao de Nariño se genera en la costa pacífica (Soic, 2014), y proviene principalmente de árboles con características genéticas regionales, adaptados a una zona caracterizada por la presencia de bosques húmedos tropicales.

Un cacao sin fermentar tiene un alto contenido en fenoles y durante la fermentación y el secado se forman precursores sensoriales como alcaloides (cafeína y teobromina) y acidez volátil que son indicadores de la calidad del grano del cacao. (Bucheli *et al.*, 2001). En las etapas de fermentación y secado se han detectado pérdidas importantes de fenoles; por ello se llevó a cabo la determinación de las concentraciones iniciales en que estas sustancias con propiedades funcionales están presentes en el grano de materiales regionales de cacao, antes de iniciar procesos de post cosecha con la aplicación de la técnica de Folin Ciocalteu, ya que pueden generar un valor agregado para los productos derivados de este material vegetal.

El procedimiento de extracción de fenoles se ha realizado bajo diferentes metodologías en donde existen varios factores que lo afectan, por tal motivo en este estudio se optimizó dicho proceso en el cual se logró establecer los niveles óptimos de los factores relación soluto-solvente, temperatura, tiempo de extracción y el tipo de solvente, utilizando la técnica de ultrasonido; también se logró cuantificar la actividad antioxidante de los materiales regionales mediante la capacidad de inhibir radicales con los métodos 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2-azino-bis (3- etilbenzotiazolino -6-ácido sulfónico) (ABTS•+).

La optimización de la técnica y cuantificación de fenoles y capacidad antioxidante de materiales regionales para la determinación de la línea base de contenidos iniciales, hace parte del proyecto de Ciencia Tecnología e Innovación denominado “Estudio para

el mejoramiento de la productividad y calidad sensorial (aroma y sabor) del cacao (*Theobroma cacao* L) regional del departamento de Nariño” de la Corporación para la Investigación Aplicada al Desarrollo CIAD.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar el proceso de extracción por ultrasonido de polifenoles en grano para su cuantificación y la determinación de la capacidad antioxidante en materiales de cacao regional de Nariño.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.2.1. Implementar los métodos analíticos para la determinación de polifenoles totales (método Folin-Ciocalteu) y capacidad antioxidante (métodos DPPH y ABTS).

1.2.2. Evaluar los factores que intervienen en el proceso de extracción por ultrasonido de polifenoles en granos de cacao, para determinar los niveles óptimos de dichos factores.

1.2.3. Cuantificar los polifenoles totales presentes en el grano de cacao Nariñense, por el método Folin-Ciocalteu.

1.2.4. Determinar la capacidad antioxidante (métodos DPPH y ABTS) en materiales de cacao regionales del departamento de Nariño.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. EL CACAO

2.1.1. Generalidades

Theobroma cacao L, es una especie originaria de los bosques tropicales húmedos de América del Sur. (Chanatasig, 2004). Es un árbol perenne que produce frutos tamaño promedio de 20 cm de largo por 10 cm de ancho y peso aproximado de 400 a 500 g, consta de una cáscara o cubierta (testa) que representa el 10-14% del peso del cacao seco y una almendra o cotiledón que constituye casi la totalidad del peso restante (86-90%) (De Morales et al, 2012)

2.1.2. Diversidad de Cacao

Los árboles de cacao tienden a ser agrupados por tradición en tres grupos principales llamados Criollo, Forastero y Trinitario; de los cuales muchos híbridos han sido y continuarán siendo desarrollados (ITC, 2001). Los cacaos Criollos se caracterizan por tener frutos alargados, mazorcas de color rojo o amarillo en la madurez, los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido; los cacaos Forasteros conocidos también como cacaos Amazónicos y/o amargos, tienen granos aplanados, pequeños de color morado y sabor amargo; los Trinitarios no son encontrados en estado silvestre, son descendientes de cruces entre los Criollos y poblaciones locales de Forasteros; la mayor parte de América del Sur está ocupada por esta variedad. Las poblaciones de Trinitario tienen características de mazorca y semilla usualmente variables, debido a los caracteres altamente contrastantes de sus ancestros. (Chanatásig, Vaca 2004; Wollgast, 2005).

2.1.3. Composición química del cacao

El cacao posee un elevado valor nutricional, es considerado fuente de energía por su contenido en hidratos de carbono, grasas, elementos minerales (magnesio, fósforo y hierro) y antioxidantes (fenoles entre el 5 y 10%). La almendra de cacao contiene aproximadamente un 50% de lípidos que en conjunto se denominan manteca de cacao. En su mayoría corresponden a triacilgliceroles simétricos que poseen ácido oleico en posición 2. Los ácidos grasos que se encuentran son ácidos esteárico, palmítico y ácido oleico, los cuales varían un poco según el origen geográfico. También, se encuentran esteroides, trazas de vitamina D2 y bases xánticas, principalmente teobromina (3,7-dimetilxantina) en una proporción del 1-3% y en menor proporción cafeína (0,05-0,3%) (Tannenbaum, 2004).

Tabla 1. Composición química del cacao

COMPONENTES	GRANO (%)
AGUA	5.0
GRASA	54
CAFEINA	0.2
TEOBROMINA	1.2
FENOLES	6.0
PROTEINA BRUTA	11.5
MONO Y OLIGOSACARIDOS	1.0
ALMIDON	6.0
PENTOSANOS	1.5
CELULOSA	9.0
ACIDOS CARBOXILICOS	1.5
OTRAS SUSTANCIAS	0.5
CENIZA	2.6

Fuente Chocolate: A Marvelous Natural Product of Chemistry. Ginger Tannenbaum.

Wollgast, J. (2007) en su investigación “Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification” desarrollada en el Instituto para la salud y protección al consumidor de Italia, afirma que los fenoles del cacao se encuentran almacenados en células pigmentarias, cotiledones. En dependencia de la cantidad de antocianinas estas células pigmentarias, también llamadas células de almacenamiento de fenoles, se tornan de colores desde blanco hasta púrpura oscuro o café. Se han identificado tres grupos de fenoles en el cacao: catequinas con un 37%, antocianinas con un 4% y proantocianidinas con un 58%. La principal catequina encontrada es la (-)- epicatequina con un porcentaje de 35% del contenido total de fenoles.

2.1.4. El cacao en la economía

Desde hace más de dos siglos, el cacao en grano se ha destacado como un rubro de gran importancia comercial en el ámbito mundial, ya que éste es utilizado como materia prima para la obtención de diversos productos de la industria de alimentos (confitería, bebidas), la industria cosmetológica y la farmacéutica (Rivera et al 2013).

En Colombia el cacao es uno de los principales productos agrícolas ya que constituye una alternativa económica y sostenible para el desarrollo rural. Nariño ocupa el cuarto

lugar dentro de los departamentos productores de Cacao (*Theobroma cacao L*) después de Santander, Arauca, y Antioquia; el cacao Nariñense se produce principalmente en la costa pacífica, en jurisdicción del municipio de Tumaco y goza de un gran reconocimiento por su calidad organoléptica; a diferencia de otras regiones del país, este cacao proviene principalmente de materiales vegetales regionales (García et al, 20129).

2.1.5. Propiedades para la salud del cacao

Se ha evidenciado que el cacao y sus derivados presentan una gran variedad de propiedades beneficiosas para la salud en humanos. Algunos reportes señalan que el consumo de cacao o chocolate reduce el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares por el efecto de los flavonoides presentes en los granos de cacao (Keen *et al.*, 2005). Varios estudios en humanos han mostrado el efecto de los fenoles del cacao en los niveles lipídicos, como una disminución en el colesterol total y regulación en la presión arterial sistólica y diastólica (Heiss *et al.*, 2010). También, inactivan radicales superóxido, hidroxilo y radicales lipídicos; así mismo, inhiben la peroxidación lipídica *in vitro* e *in vivo* (Schinella *et al.*, 2010). Además, se ha observado el mejoramiento en la capacidad vasodilatadora de las arterias braquiales, en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias, al suministrarles bebidas de cacao (Cherniack, 2011).

Con respecto al efecto de los antioxidantes del cacao sobre la salud, numerosos estudios han demostrado que su consumo y el de productos de chocolate aportan grandes beneficios a los seres humanos. Entre los hallazgos más recientes están los reportados por los investigadores de la Universidad de Harvard, (Bayard, et al., 2007) quienes afirman que los indios Kuna de Panamá, presentan bajos niveles de enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades coronarias y diabetes, debido al consumo de 40 tazas de chocolate semanales. Particularmente todos estos efectos saludables se atribuyen a la (-)-epicatequina.

2.2. FENOLES

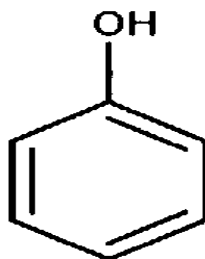
El termino fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Martínez, 2015).

2.2.1. Polifenoles

De acuerdo a WBSSH (White-Bate-Smith-Swain-Haslam) los polifenoles son compuestos fenólicos solubles en agua con una masa molecular entre 500 a3000 - 4000 Da , que possen de 12 a 16 grupos hidroxilos fenólicos sobre 5 a 7 anillos aromáticos por 1000 de masa molecular relativa y con propiedades para precipitar alcaloides y proteínas. (Haslam, and Cai 1994).

Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Figura 1. Estructura de los fenoles



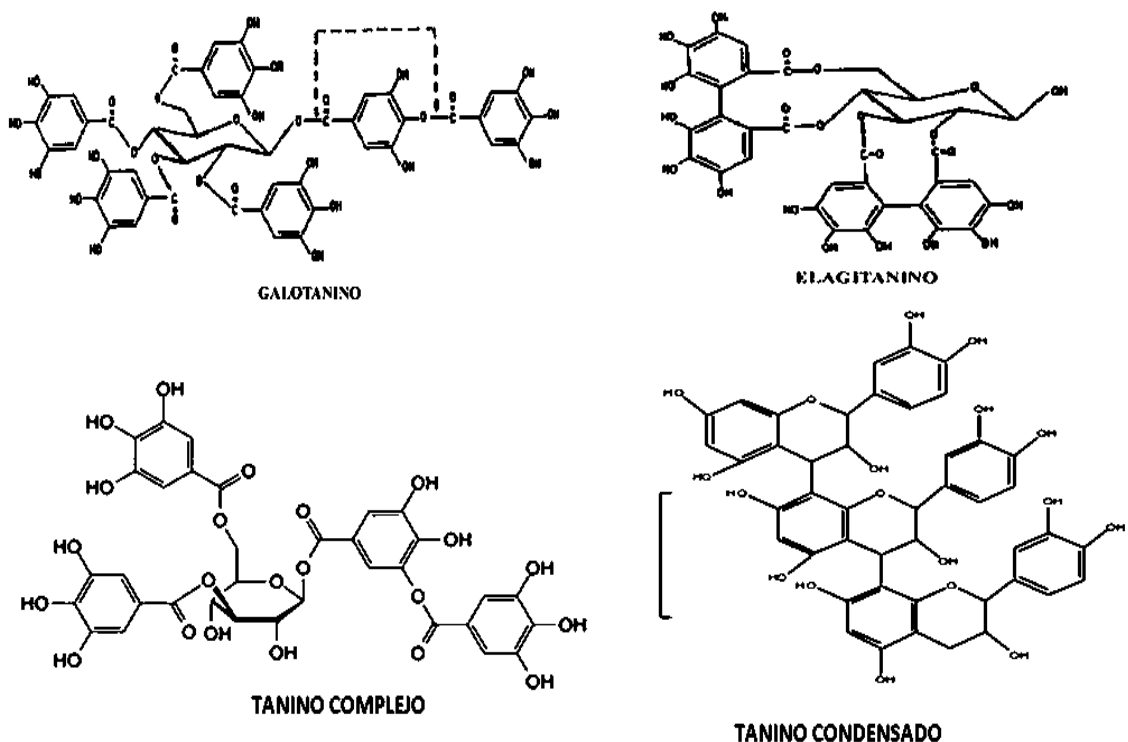
Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo hidroxilo (Robbins 2003).

2.2.2. Tipos de fenoles

➤ **Taninos**

Los taninos son polímeros fenólicos de alto peso molecular que se clasifican en: *Taninos hidrolizables* (pirogálicos) como su denominación indica se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática, entre los taninos hidrolizables se distinguen los taninos gálicos y los *Taninos condensados* (no hidrosolubles) se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular. Químicamente se forman por condensación de catequinas o catecoles (flavanoles) con uniones directas C-C entre las moléculas, generalmente 4 β - 8 ó en 4 β - 6 y no contienen azúcares en su estructura. Biogenéticamente proceden del metabolismo de los flavonoides, se forman a partir de una flavanona por hidroxilación en el C-3. Se destacan los taninos catéquicos (formados por 2 o más moléculas de 3-flavanoles) y los leucoantocianos o procianidoles (formados por 2 o más moléculas de 3,4-flavandioles) (Paladino, 2008).

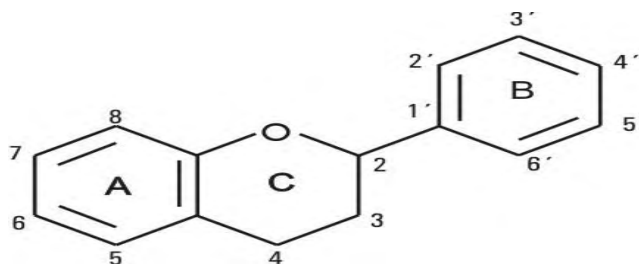
Figura 2. Clasificación de los Taninos (Khnbabae, et al 2001).



➤ Flavonoides

Los flavonoides son el grupo más abundante en los vegetales, son compuestos de bajo peso molecular que generalmente están enlazados a moléculas de azúcar. Esta estructura básica (Figura 3) permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo A y C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en: 1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C. 2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4, un doble enlace entre C-2 y C-3 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C. 3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, un doble enlace entre C-2 y C-3 y carecen del grupo hidroxilo en posición C3. 4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 y el anillo C tiene dos dobles enlaces permitiendo que la molécula quede toda conjugada pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Bors, W., et al 1990). 5. Isoflavonas un doble enlace entre C-2 y C-3 y un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, además el anillo heterocíclico B ocupa la posición 3. 6. Dehidroflavonoles, como la dihidroquercitina, son precursores directos de flavandioles y flavonoles. 7. Leucoantocianidinas derivadas del flavon 3-4 diol.

Figura 3. Estructura básica de los flavonoides



➤ **Ácidos Fenólicos**

Los ácidos fenólicos y sus derivados son muy abundantes en el reino vegetal, distinguiéndose el ácido cinámico y el ácido benzoico o sus derivados. Entre los principales ácidos fenólicos que encuentran aplicaciones alimenticias, se destacan el caféico (presente en el café en su forma esterificada) y el Ferúlico (Pinelo et al., 2004).

2.2.3. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos pueden dividirse en dos grandes grupos: No flavonoides y flavonoides. Creus, E. G. (2004).

- No flavonoides
 - Ácidos fenólicos:
 - Serie benzoica
 - Serie cinámica
 - Estilbenos
 - Taninos hidrolizables
- Flavonoides
 - Flavonoles
 - Flavanoles
 - Antocianinas
 - Flavonas
 - Isoflavonas
 - Flavanonas

2.2.4. Propiedades de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por sus propiedades antioxidantes, son susceptibles a ser oxidados y además impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes. Pueden además actuar como quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales (Creus, 2004).

Los fenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, anti-diarreicas, antiúlcera, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la anti-mutagénica, anticancerígena y anti-envejecimiento (Larrea 2012).

La (+)-catequina ha demostrado prevenir la oxidación del plasma humano e inhibir la oxidación de las LDL. Los flavonoides pueden explicar los efectos protectores de la dieta mediterránea (rica en vegetales, frutas y vino) contra las enfermedades cardiovasculares, además son la clase predominantemente descrita de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente 2/3 de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario. El rango de consumo es de 25 mg a 1g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias) (Robbins 2003) ;(Hagerman, Riedl et al. 1998).

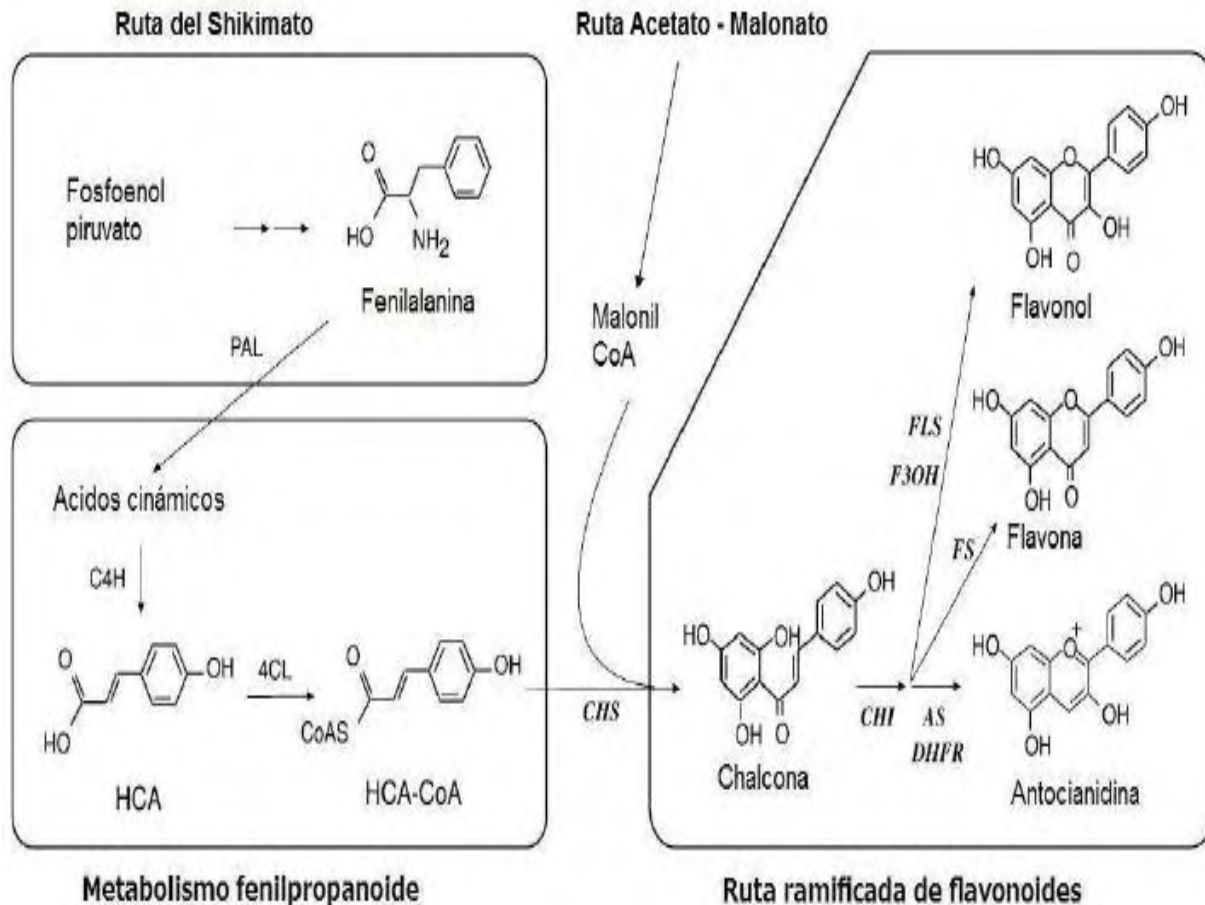
Martínez, S. (2002) en su estudio “Los flavonoides: propiedades y acción antioxidante” desarrollado en la Universidad de León, España, afirma que el creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones.

2.3. COMPUESTOS FENOLICOS EN LAS PLANTAS

Entre los fenoles de las plantas se pueden encontrar moléculas simples como ácidos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoides o compuestos polimerizados como ligninas y taninos. Sin embargo, los flavonoides caracterizados por presentar un sistema C6–C3–C6, constituyen uno de los grupos fenólicos más numerosos e importantes. Biosintéticamente, estos compuestos pueden considerarse como tetracétidos de síntesis mixta, ya que utilizan el *p*-cumaroil-CoA como molécula iniciadora, a la cual se

unen tres moléculas de malonil-CoA. El *p*-cumaroil-CoA proviene de la ruta del ácido shikímico y el malonil-CoA implica a la ruta del acetato-malonato figura 4. (Quintero 2012)

Figura 4. Ruta del acetato-malonato y ruta ácido shikímico.



2.3.1. Fenoles en cacao

Los fenoles en los granos de cacao son almacenados en las células pigmentarias de los cotiledones, y le aportan colores que van desde el blanco hasta un morado oscuro, dependiendo de la cantidad de antocianinas almacenadas.

En los frutos de cacao se pueden distinguir 3 tipos de fenoles: catequinas o flavan-3-oles (37 %), antocianinas (4 %) y proantocianidinas (58 %). La principal catequina es (-)-epicatequina con un máximo de hasta 35 % del contenido de fenoles.

Los principales grupos de fenoles contenidos en el grano de cacao con su composición son:

➤ **Flavonoides**

Los fenoles más abundantes en la semilla de cacao son flavonoides, entre 6 y 8 % de peso seco (Grassi *et al.*, 2008). Alguno de ellos son (+)- catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (+)-epilagocatequina (Rimbach, *et al.*, 2009).

➤ **Procianidinas**

En las semillas de cacao mediante técnicas de HPLC y espectrometría de masas se han encontrado diversas procianidinas como la B1, B2, B3, B4, B5, C1 y D (Hammerstone *et al.*, 1999 y Marcano y Hasegawua, 2002). El efecto de estas sustancias es de interés por su potente actividad biológica, capacidad antioxidante y reducción de riesgo de enfermedades cardiovasculares, formación de coágulos. (Santos-Buelga y Scalbert, 2000, Rios, *et al.*, 2002; Rusconi, *et al.*, 2013)

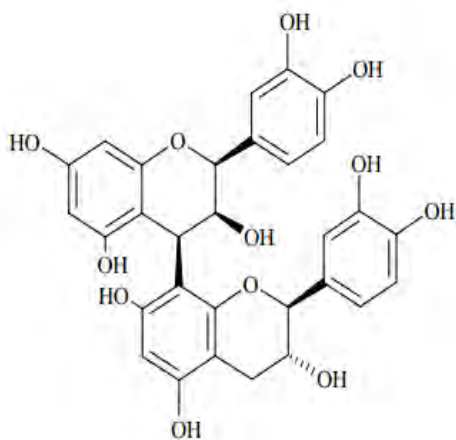
➤ **Antocianinas**

En el cacao se encuentran la cianidin 3- α -L(-) arabinosa y la cianidin 3- α -L(-)galactosa, estos son compuestos de naturaleza hidrosoluble y responsables de los colores rojo, púrpura y azul de las plantas y frutos, cuando carecen del grupo glúcido se denominan antocianidinas. Análisis de antocianinas (cianidina-3-glucósido) mediante espectrofotometría UV, realizados por Chávez Rivera y Ordoñez, (2013) en semillas de cacao enteras mostraron contenidos de 1,490 \pm 0,043 mg/g.

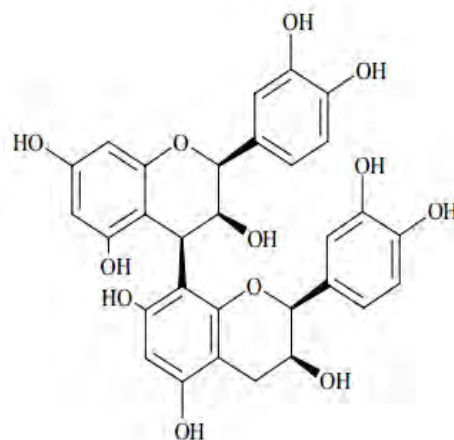
➤ **Resveratrol**

Este compuesto que se ha reportado tiene propiedades antioxidantes, anti cancerígenas y cardioprotectoras (Vidavalur *et al.*, 2006). Se le ha encontrado en uvas, vino, jugos de uvas, arándanos, etc. (Wang *et al.*, 2002). Counet, *et al.* (2006) reportó que mediante HPLC ha identificado *trans*-resveratrol en licores de cacao (0.4 ppm) y chocolate obscuro (0.5 ppm) en muestras provenientes de Costa de Marfil.

La capacidad antioxidante está relacionada con el grado de polimerización. Las estructuras oligoméricas semilargas, como las que se encuentran en el cacao, pueden ser más eficaces que los compuestos monoméricos. Se ha demostrado que las procianidinas de 2 a 5 unidades poseen una mayor actividad antioxidante que los monómeros o los polímeros de más de 5 unidades de epicatequina. Probablemente sea debido a su mejor biodisponibilidad (transporte a través de membranas, absorción, etc.). (Del Fresno, *et al.*, 2005).



Procianidina B4



Procianidina B3

Figura 5. Estructuras químicas de las procianidinas dimericas (enlace tipo B) B4 y B3.

También se ha comprobado que los fenoles del cacao inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno y anión superóxido, en granulocitos activados por ésteres de forbol o linfocitos activados por menadiona (Del Fresno et, al 2005).

Osman, H. (2004) en su estudio “Extracts of cocoa leaves and their antioxidation potencial” realizado en la Universidad de Kebangsaan, Malasia, comprobó que el cacao, tanto en hojas como en semillas, tiene mayor cantidad de fenoles en relación con el te verde. El contenido total de fenoles es significativamente más alto en las hojas de cacao con un porcentaje de 28,0%, las semillas presentan un contenido de 19, 0% en comparación con el té verde que contiene 17.3%. Los altos contenidos de fenoles en cacao, se pueden atribuir, según Osman, a la edad de los árboles, ya que se ha demostrado que durante la etapa de la madurez se aumenta la concentración de fenoles en cacao.

Padilla, F. (2008) en su investigación “Contenido de fenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces”, desarrollada en Caracas, Venezuela, compara el contenido de fenoles, la actividad antioxidante, el poder reductor y la actividad anti-radical de las semillas de *Theobroma cacao* (cacao), *Campsiandra comosa* Benth (chiga), *Sorghum bicolor*, L. Moench (sorgo) y *Melicoccus bijugatus* (mamón) a partir del método de Folin-Ciocalteu y el método del β -caroteno/linoleato respectivamente. Los resultados demostraron que las semillas de *Theobroma cacao* presentan el más alto contenido de fenoles (6,66 Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) g/100g) en relación con los otros productos estudiados. Así mismo, el poder reductor y la actividad antioxidante del cacao comparable a la del butil hidroxianisol (BHA), antioxidante sintético resultó ser el más alto.

2.4. EFECTO DEL PROCESAMIENTO DEL CACAO EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS

El tratamiento del grano de cacao durante el proceso de beneficio (fermentación y secado) y su transformación industrial puede afectar el contenido de fenoles y por tanto, la funcionalidad del grano como agente antioxidante. En etapas como la fermentación y el secado, donde se desarrollan los precursores del aroma y sabor, y en el tostado y la alcalinización donde se definen las características organolépticas, se han detectado pérdidas importantes de fenoles.

En el secado ocurren reacciones de oxidación no enzimática que son aceleradas por el incremento de oxígeno al cual está expuesto el tejido de los granos. Durante esta etapa sigue el desarrollo de los precursores de sabor y aroma, con la aparición del color marrón característico. Además, cuando las semillas de cacao son sometidas a este proceso enzimático su contenido de fenoles continúa reduciéndose (Pallares et al 2016).

Durante la fermentación de los granos de cacao, los fenoles difunden desde los compartimientos celulares y se oxidan para producir taninos insolubles de alto peso molecular (Quintero, A. 2012) En la fermentación aerobia se forman en los granos pigmentos marrones constituidos por fenoles; la epicatequina y catequina se oxidan a quinonas, y la condensación de las proteínas y fenoles causan una reducción de la astringencia y sabor amargo. Las quinonas también pueden acomplejarse con aminoácidos, péptidos, proteínas o polimerizar con otros flavonoides. Los taninos de alto peso molecular se acomplejan con proteínas a través de puentes de hidrógeno, y el resultado de estas reacciones es un pigmento marrón, insoluble en agua. Los granos frescos de cacao contienen pigmentos antocianínicos morados, como el cianidin-3- α -L-arabinosido y cianidin-3- β -Dgalactósido. Durante la fermentación, estos pigmentos son hidrolizados por glicosidasas, que provocan una decoloración de los cotiledones. (Zapata, 2013).

Ortiz et al (2009) estudiaron la variación de taninos en granos de cacao frescos, fermentados y secos. Encontraron que del 1.13% de taninos en granos frescos, se reducían a un 1% en la fermentación y finalmente a un 0.82% en el secado, además observaron que la humedad, el pH, la acidez y las proteínas también se veían afectados (Ortiz, Graziani et al. 2009). Álvarez et al, (2012) analizaron el contenido de fenoles del cacao cultivado en la región de Cuyagua (Venezuela) y lo compararon con un tipo de cacao comercial, obteniendo que el contenido de fenoles para el primero oscilaba de 0,03% a 0,36% y un 0,11% correspondía a la muestra comercial.

Kyi et al (2005) estudiaron el secado del cacao y encontraron que la concentración de fenoles en los granos de cacao disminuye rápidamente durante el secado, cuanto mayor sea la temperatura y la humedad relativa del aire de secado, se da más rápido las reacciones químicas dentro del grano de cacao (Kyi, Daud et al. 2005). Además, la cinética de la reacción de oxidación de los fenoles y las reacciones de condensación se comporta como una reacción de primer orden.

Faborode et al (1995) evaluaron la calidad del granos de cacao secos y encontraron que los mejores resultados se obtenían cuando se secaba a temperaturas bajas. Sin embargo, el secado continuo a una temperatura de 60°C no afecta negativamente la calidad del grano. Del mismo modo la eliminación del mucílago de los granos fermentados antes del secado no tiene ningún efecto adverso (Faborode, Favier et al. 1995).

2.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato (Payne et al., 2010).

En determinadas situaciones las defensas antioxidantes del organismo pueden verse desbordadas por la excesiva generación de especies reactivas del oxígeno; este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento (Pereira et al., 2013).

La dieta desempeña un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal, entre ellos, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo ampliamente investigados en los últimos años (Diaz, 2011).

2.5.1. RELACIÓN ESTRUCTURA - ACTIVIDAD

La capacidad antioxidante se atribuye a la distribución de los grupos funcionales en la estructura, pues muchos años de investigación sobre la relación estructura-actividad han demostrado la importancia de componentes estructurales específicos como requisitos para la actividad, dentro de los que se encuentran la distribución espacial y el número de grupos hidroxilo en la estructura, puesto que la capacidad para atrapar las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), depende de la alta reactividad de dichos grupos. (Avila 2009)

La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo A, también aumenta el poder antioxidante de estos compuestos polifenólicos, debido a que esto contribuye a la planaridad de la estructura, favoreciéndose de esta manera la conjugación, la deslocalización electrónica, así como también incremento de la estabilidad de los radicales fenoxilo (Heim, et al. 2002). Así mismo, el impedimento estérico generado por la metilación de los grupos 3´4´-catecol o los grupos OH del anillo A, disminuye significativamente la capacidad antioxidante (Heim, et al. 2002).

Adicionalmente, se debe considerar que la actividad antioxidante de una mezcla no es resultado de la suma de las actividades antioxidantes de cada uno de los componentes,

sin embargo, la interacción de los propios compuestos entre sí, puede generar efectos sinérgicos (Rodríguez y García, 2003)

2.6 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones, esto puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro. Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: (1) Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y (2) Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (Huang et al., 2005). (Ver figura 6)

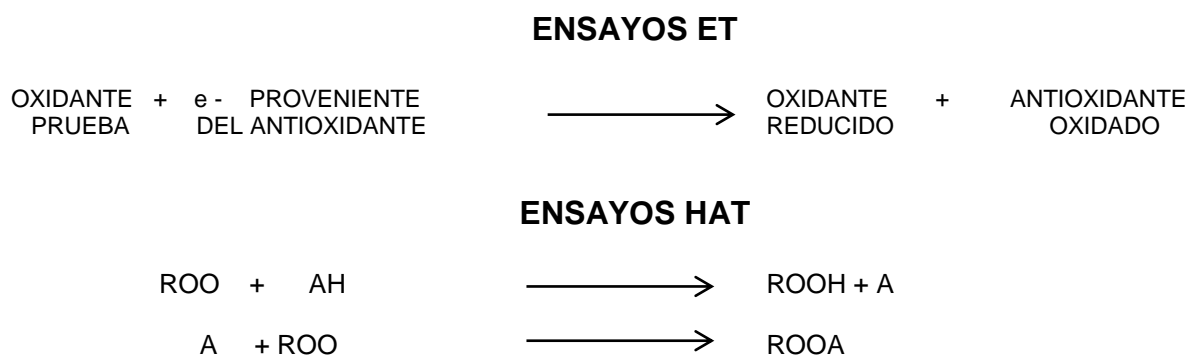


Figura 6. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrogeno (Huan et al ,2005)

Tabla 2. Clasificacion de los modelos de ensayo in vitro según la reaccion ET o HAT

ENSAYO	CATEGORIA
ACIDO2,2-AZINO-BIS-3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFONICO (ABTS)	ENSAYOS BASADOS EN LA TRANSFERENCIA DE ATOMOS DE HIDROGENO (HAT)
1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZILLO (DPPH)	
PODER DE REDUCCION ANTIOXIDANTE DE HIERRO (FRAP)	
N,N-DIMETIL-p-FENILENDIAMINA (DMPD)	
CAPACIDAD DE ABSORCION DEL RADICAL OXIGENO (ORAC)	ENSAYOS BASADOS EN LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES
PARAMETRO ANTIOXIDANTE DE CAPTURA DE RADICALES (TRAP)	
INHIBICION DE LA OXIDACION DEL ACIDO LINOLEICO	
INHIBICION DE LA OXIDACION DE LOS LIPIDOS DE BAJA DENSIDAS (LDL)	

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH• es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS•+ se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Tovar del Rio 2013). Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados.

2.6.1. Método ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Este se basa en la formación del catión radical 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico), conocido como radical ABTS•+. El catión radical se prepara luego de hacer reaccionar ABTS (Figura 7) con persulfato potásico (Kuskoski 2004). La ventaja del radical es su estabilidad cuando se encuentra en refrigeración y lejos de la luz. Estos factores permiten almacenar una solución de trabajo por aproximadamente seis meses.

El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un radical hidrógeno y estabilizar al catión radical ABTS•+. La decoloración que la solución de ABTS•+ experimenta en la reacción, se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón derivado de la vitamina E conocido como Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), mediante una curva de calibración. Por esta razón el resultado se expresa como capacidad antioxidante en equivalentes Trolox o TEAC (del inglés: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Okezie 2002).

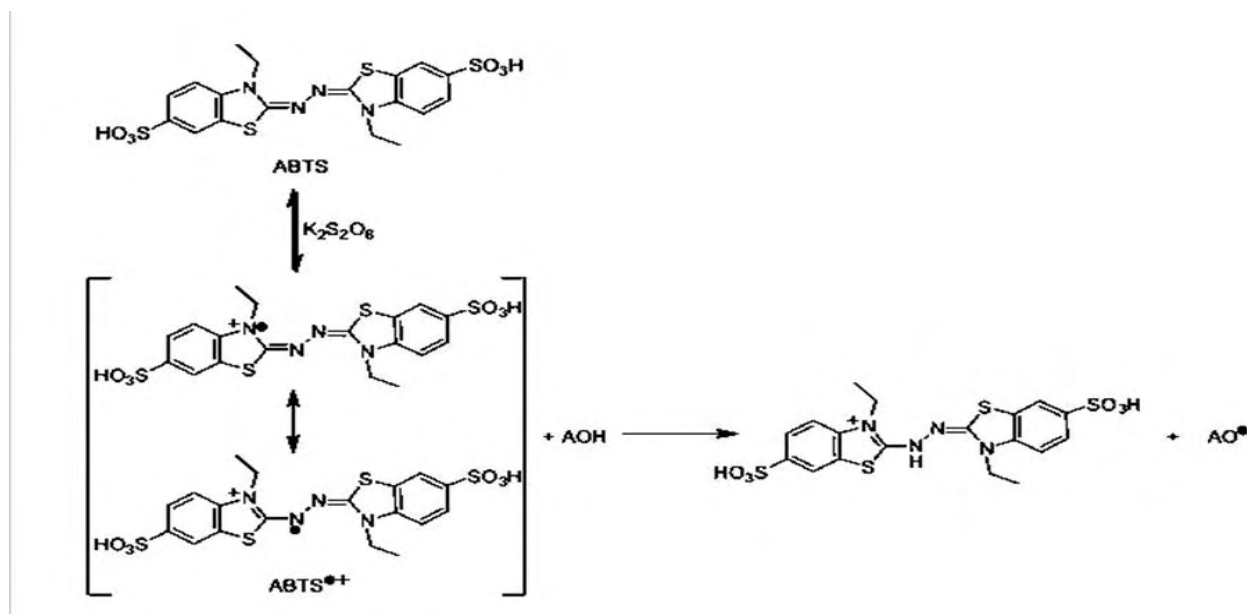


Figura 7. Reacción de ABTS (Kuskoski 2004).

2.6.2. Método 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 8, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo DPPH ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Ojha et al., 2012).

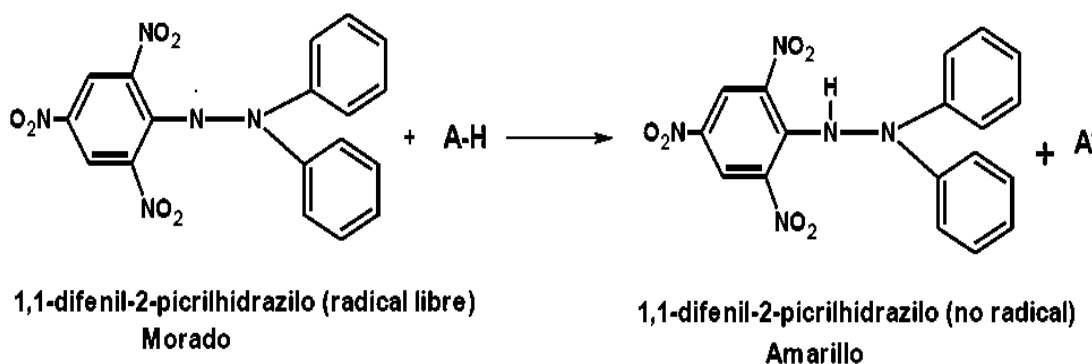


Figura 8. Reacción de DPPH (Ojha et al., 2012).

Los resultados del ensayo DPPH• se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC_{50} cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH• usado (Deng et al., 2011). Otro método para expresar la actividad atrapadora del radical libre DPPH, consiste en utilizar una curva del antioxidante Trolox a diferentes concentraciones, para equiparar los resultados obtenidos de los extractos con una determinada concentración de dicho antioxidante y expresar de ese modo los resultados como Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox (TEAC). (Zapata 2013).

2.6.3. Método Folin Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias, por su simplicidad, por la disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (Singleton et al., 1999). Inicialmente, fue aplicado al análisis de proteínas tomando como ventaja la actividad del reactivo frente al residuo de proteína, tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después este ensayo se extendió al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se le ha encontrado muchas aplicaciones.

El reactivo de F-C utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, que no es específico para fenoles. De hecho, el ensayo de F-C mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones entre el Mo(VI) y el reductor como se muestra en la figura 9 (Huang et al., 2005). El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdo tungstofosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdo tungstofosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (Cicco et al., 2009).



Figura 9. Reacción de transferencia de electrones con el reactivo de Folin-Ciocalteu. (Huang et, 2005)

La concentración de fenoles se reporta en términos de concentración equivalente de ácido gálico por g de muestra. (Folin-Ciocalteu, 1927, Castro, H. 2008).

El reactivo de Folin-Ciocalteu, a pesar de ser el más comúnmente empleado para la determinación del contenido de fenoles, puede reaccionar con compuestos no fenólicos, como son el ácido ascórbico, los azúcares y los aminoácidos, produciéndose así una sobrevaloración del contenido fenólico (Barros, et al. 2009)

2.7. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE FENOLES

La extracción de compuestos polifenólicos a partir de material vegetal está influenciada por la naturaleza química de los compuestos, el método, el tamaño de la muestra, el tiempo y las condiciones de almacenamiento, al igual que la presencia de sustancias interferentes tales como proteínas y carbohidratos. (Koffi et al 2010, García Márquez et al 2012).

Se ha reportado que el uso de soluciones acuosas de metanol, etanol y acetona mejora sustancialmente la extracción de fenoles comparado con un sistema de solvente de un único compuesto (Yilmaz y Toledo, 2006). Los métodos de extracción más reportados son la maceración con solventes, extracción con agua caliente, extracción alcalina,

extracción basada en resinas, extracción asistida por enzimas, extracción basada en irradiación de haz de electrones o radiación gamma, y extracción usando fluidos supercríticos. Sin embargo algunos de estos métodos pueden causar una pérdida de compuestos bioactivos debido al uso de altas temperaturas y largos tiempos de extracción o, en el caso de la irradiación, puede representar un riesgo para la salud, si no se toma la adecuada protección. (Liu et al, 2005).

Estos inconvenientes han conducido al uso de técnicas innovadoras y sustentables que incrementan la eficiencia de la extracción, reducen el tiempo y el consumo de energía y contribuyen a la preservación del medio ambiente por la reducción del uso de agua y solventes, energía fósil y generación de sustancias peligrosas; tales como microondas y la extracción asistida por ultrasonido (Chemat et al, 2011).

El uso de radiación ultrasónica (20-100 kHz) para extraer compuestos naturales provee una alta reproducibilidad, fácil manipulación, bajo consumo de solvente y energía, procesamiento a baja temperatura y baja pérdida de compuestos bioactivos. (Pan et al, 2011). Esta técnica utiliza vibraciones mecánicas en frecuencias superiores al rango audible para el oído humano (1-16kHz), estas frecuencias tan altas crean ciclos de expansión, que a su vez generan presiones negativas y burbujas. Cuando el material por el que viaja la onda sonora es líquido, las burbujas se forman, crecen y finalmente colapsan, dando lugar a un fenómeno de mecánica de fluidos conocido como cavitación.

Comparado con otras nuevas técnicas de extracción tales como la extracción asistida por microondas, los aparatos de ultrasonido son más económicos y su operación es más fácil. Además, la extracción asistida por ultrasonido, como la extracción Soxhlet, pueden ser usadas con cualquier solvente para la extracción de una gran variedad de compuestos naturales. (Wang y Weller, 2006)

El ultrasonido puede facilitar la hidratación del tejido vegetal, permitiendo la alta difusión a través de las paredes celulares, incrementando la transferencia de masa. De otro lado, la cavitación producida por las ondas del ultrasonido pueden también romper las paredes celulares, facilitando la liberación de contenidos. (Vinatoru, 2001)

Según Azuola y Vargas (2007), el método de extracción asistido por ultrasonido, por su eficiencia, bajo costo y posibilidad de extracción a bajas temperaturas, se ha convertido en una herramienta ampliamente aplicada tanto en la industria como en el laboratorio.

2.8. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

2.8.1. Elección de las variables

La extracción de compuestos polifenólicos a partir de materiales vegetales está influenciada por la temperatura, método y tiempo de extracción, tipo y relación entre solventes, relación soluto-solvente, tamaño de partícula y pH de extracción (Chirinos et al., 2007; Pinelo et al., 2004). Debido a que no existe un método universal para la

extracción de fenoles en cacao, es importante estudiar la influencia de dichos factores sobre el grado de extracción de estos compuestos.

Dentro de los estudios encontrados respecto a la extracción de fenoles en cacao, existe un rango amplio para cada uno de los factores en consideración; por ejemplo métodos muy variados de extracción como maceración con solventes o extracción asistida por ultrasonido, entre otros (Zapata et al., 2013; Quiroz-Reyes et al., 2013); tiempo de extracción entre 10 - 60 min, para el método por ultrasonido (Gu et al., 2006; Gil, 2012); relación soluto-solvente entre 1:10 - 1:30 (w/v) (Wollgast, 2004; Alañón et al., 2016); temperatura de extracción entre 20 - 37 °C (Di Mattia et al., 2013; Gu et al., 2006); y como solventes etanol-agua (80:20), metanol-agua (70:30), metanol (100%), isopropanol-agua (60:40) y acetona-agua-ácido acético (70:29.5:0.5) (Cadena y Herrera, 2008; Radojic et al, 2009; Zapata et al., 2013; Quintero, 2012; Di Mattia et al., 2013)

Quintero (2012) en su estudio sobre fenoles en cacao, encontró que la extracción asistida por ultrasonido es más eficiente que la extracción convencional por agitación. Quiroz-Reyes (2012) determinó que el contenido total de fenoles del cotiledón de cacao, es estadísticamente superior cuando se utiliza el método por EAU en comparación al método de maceración con solventes. Dados estos antecedentes y a las ventajas que ofrece el método de extracción asistido por ultrasonido, dicha variable (método de extracción) se mantendrá constante.

Teniendo en cuenta que la mayor parte de estudios sobre extracción de fenoles de matrices alimentarias están basados en la utilización de mezclas de disolventes, generalmente acuoso-orgánicos con pH ácidos para una mayor resolución en la caracterización y una mayor estabilidad de determinados compuestos. (Ju y Howard, 2003); que los valores de pH de las muestras de cotiledones fermentados varían desde 6.3 al inicio de la fermentación hasta valores de 5.4 a las 72 horas de fermentación; valores que son considerados ligeramente ácidos (Di Mattia, 2012); y que la parte orgánica de los sistemas de disolventes acuoso-orgánicos no altera de manera significativa el pH de la solución, se determinó que no se realizará modificación del pH para el proceso de extracción.

Larrea (2012) en su estudio sobre la optimización de las condiciones de extracción de fenoles en uva, encontró que la mayor extracción de dichos compuestos se presenta con una intensidad de ultrasonido del 100% de la capacidad del equipo que corresponde a 40 kHz. Prieto, et al. (2011) en su estudio sobre extracción con ultrasonido de compuestos fenólicos presentes en cáscara de uva encontraron que la mayor extracción se obtiene con la mayor potencia de ultrasonido que produce el equipo. Por tanto en el presente estudio se mantendrá estable este factor en su mayor potencia.

2.9. VERIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALITICOS

La verificación, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un método normalizado modificado para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo. En ocasiones, lo que se busca a través de una validación es demostrar que un método es equivalente a otro. El objetivo de la verificación, es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados. De este modo se puede definir la verificación como el suministro de prueba(s) objetiva(s) de que un elemento dado satisface el (los) requisito(s) especificado(s). Es decir, es la comprobación experimental de que un método establecido funciona de acuerdo con las especificaciones, en las condiciones disponibles en el laboratorio usuario. Se entiende como verificación a las pruebas realizadas por un laboratorio en la rutina de trabajo que permiten comprobar y documentar la aplicabilidad y uso adecuado del método por parte del laboratorio. (Duffau et al, 2010).

➤ **SELECTIVIDAD**

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés. Una prueba de selectividad comúnmente utilizada, consiste en analizar un mínimo de tres testigo reactivos, tres blancos de matriz y tres muestras o estándares de concentración conocida del analito de interés. Se deben comparar las lecturas (señales de medición) obtenidas para cada caso, y observar si existen variaciones entre los testigos reactivos, blancos de matrices y estándares o muestras con analito. Si se encuentran diferencias significativas deberán ser identificadas y en lo posible eliminadas.

➤ **LINEALIDAD**

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como función respuesta normalmente llamada recta de calibrado ésta se establece con una cierta regularidad a partir de una serie de patrones de trabajo de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo.

➤ **PRECISIÓN**

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de variabilidad y se calcula como desviación estándar de los resultados o también como coeficiente de variación.

- Repetibilidad: Evalúa la variabilidad de los datos bajo las condiciones en donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. Se puede determinar registrando a lo menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y en corto intervalo de tiempo) de un analito en un material de referencia.

- Reproducibilidad: Evalúa la variabilidad de los datos bajo las condiciones en donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros. Para determinar la reproducibilidad comúnmente se usa la comparación entre los resultados de un segundo analista de seis muestras analizadas bajo las mismas condiciones y en el mismo laboratorio que las realizadas por un primer analista. (Duffau et al, 2010)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material de cacao utilizado para los diferentes ensayos corresponde a árboles de características regionales previamente seleccionados de las parcelas de los cacaocultores de la zona del Consejo Comunitario Rescate Las Varas, Tumaco-Nariño. De cada material, se escogieron los mejores árboles en base al estado sanitario, a partir de los cuales se obtuvieron las mazorcas de cacao sanas y maduras; éstas mazorcas se introdujeron en bolsas estériles de polipropileno debidamente rotuladas con el código asignado a cada material regional, estas muestras se transportaron bajo condiciones de congelación hasta las instalaciones del laboratorio.

3.2 REACTIVOS Y EQUIPOS

Reactivos: Acido gálico, Trolox, ABTS y DPPH se obtuvieron de Sigma Aldrich; reactivo de Folin-Ciocalteu y etanol absoluto de Merck; n-hexano, acetona grado analítico y metanol grado HPLC obtenidos de Panreac; Isopropanol grado analítico de Honeywell; carbonato de sodio anhidro de Riedel-de Haen y ácido acético glacial de Carlo Erba.

Equipos: Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz Shimadzu 1800; micropipetas marca Brand de 10 - 100 μ L y de 100 - 1000 μ L; vórtex y balanza analítica.

3.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las mazorcas seleccionadas fueron desgranadas y se les retiró el mucílago que cubre los granos, los cuales se lavaron y se almacenaron en congelación a -20°C hasta la preparación de los extractos. Se tomaron 50 g de granos de cacao y se secaron en estufa a 45°C por 24 horas, según metodología descrita por Quintero, 2012, para obtener un contenido de agua inferior al 7%. Posteriormente estos granos, se trituraron en un molino fresh ground coffee.

3.3.1. Desengrasado

Se tomó 1,0 g del material vegetal seco y molido, al cual se le agregaron 10 ml de n-hexano y se llevó a baño de ultrasonido por 10 minutos a una temperatura de 30°C , para luego ser centrifugado durante 10 minutos a 3500 rpm; el sobrenadante se desechó; este proceso se realizó por duplicado (Wollgast, 2004). Seguidamente los sólidos libres de grasa se secaron en una campana de extracción a temperatura ambiente hasta completar la remoción de n-hexano (Di Mattia, et al, 2013). Adicionalmente, se tomaron 3 muestras de 1.0 g de cacao seco y molido sin desengrasar y se sometieron al mismo proceso de extracción y análisis que a continuación se describe.

3.2.2 Extracción

Se tomó 1,0 g de muestra la cual se extrajo con 20 mL de Metanol-Agua 70:30 (v/v), en un baño de ultrasonido durante 90 minutos a 20 °C, el sobrenadante se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos (Radojic et al, 2009). Luego se filtró a través de un papel filtro Whatman # 4 y se protegió de la luz manteniéndolo en viales o balones color ámbar hasta el momento del análisis de fenoles totales y capacidad antioxidante que se realizó el mismo día.

Adicionalmente, se prepararon 3 muestras de 1.0 g de cacao seco y molido realizando la extracción, pero sin centrifugar y se sometieron al mismo proceso de cuantificación.

Este procedimiento general de extracción se utilizó para la implementación de los métodos analíticos para fenoles totales y capacidad antioxidante.

3.3 IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE FENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó un trabajo previo en el cual consistió en la determinación de las condiciones de trabajo apropiadas de cada uno de los métodos; lo cual incluyó varios ensayos preliminares para definir las concentraciones de los reactivos, las diluciones de las muestras, los puntos de las curvas de calibración y los solventes más adecuados; para establecer los métodos analíticos que se describen a continuación.

3.3.1 Método de Folin-Ciocalteu para fenoles totales

El contenido de fenoles totales en los extractos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton (1965) con algunas modificaciones propuestas por Wollgast (2004): 80 µl de extracto diluido 1/10 en agua y 1250 µl de reactivo de Folin diluido diez veces se mezclaron en un vial ámbar y después de agitar, se adicionaron 2000 µl de carbonato de sodio al 7,5% w/v. Los viales se guardaron en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente, seguidamente se leyó la absorbancia de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz UV-Vis de doble haz Shimadzu 1800, usando como blanco una mezcla de los reactivos y agua en las mismas proporciones mencionadas. El análisis cuantitativo se realizó por el método del estándar externo y para ello se construyó una curva de calibración con ácido gálico (50.0–300.0 µg/ml) con el fin de expresar los resultados en términos de mg de Ácido Gálico/ g de cacao en base seca.

3.3.2 Actividad atrapadora del radical libre DPPH·

La actividad antioxidante de los extractos de las muestras se evaluó mediante la capacidad captadora del radical DPPH·, utilizando la metodología de Bondet et al (1997), con algunas modificaciones. En un vial ámbar se adicionaron 40 µl de extracto diluido 1/20 en metanol:agua (70:30) y 4 ml de una solución de DPPH 80 µM que se preparará con anterioridad en metanol. Se utilizó metanol grado HPLC como blanco.

Las mezclas se agitaron vigorosamente en un vortex y se almacenaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. La absorbancia se registró a 517 nm. Los resultados se expresan como valores TEAC (μmol de Trolox/g de cacao).

3.3.3 Actividad inhibitoria del catión-radical ABTS•+

La actividad antioxidante se estableció siguiendo la metodología de Re et al. (1999), con algunas modificaciones. El radical catiónico ABTS se generó por la reacción de oxidación del ácido [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] 7 mM con persulfato de potasio 2,45 mM, dejándolos reaccionar por espacio de 16 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. A la solución del catión radical ABTS•+ se le ajustó su absorbancia con metanol hasta $0,70 \pm 0.02$ unidades a una longitud de onda de 734 nm (solución de trabajo de ABTS•+).

Para la evaluación se hace reaccionar 4ml de la solución de trabajo del reactivo ABTS•+ con 40 μl del extracto de cacao diluido 1/20 en metanol:agua (70:30). Como blanco se usó metanol. Las mezclas se dejaron en reposo y en ausencia de luz durante 30 min. Posteriormente se midieron sus absorbancias a 734 nm. Los resultados se expresaron como valores TEAC (μmol de Trolox / g de cacao) a partir de la interpolación de la curva de calibración construida con el estándar Trolox.

3.4 VERIFICACION DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

- Selectividad: se preparó una muestra control y un blanco del extracto: la primera sustituyendo la muestra por agua destilada y agregando los reactivos que incluye la técnica y la segunda tomando el extracto de la muestra y agregando el solvente en el cual se encuentra disuelto cada uno de los reactivos de FOLIN, ABTS o DPPH para cada técnica respectiva.
- Linealidad: para la técnica de Folin-Ciocalteu se construyó una curva con ácido gálico con concentraciones de 50 - 300 $\mu\text{g/ml}$, que se ajustan al rango de absorbancia recomendado para las técnicas UV-VIS que va hasta 1,0 unidades de absorbancia, y que corresponden al rango de concentraciones promedio de las muestras a analizar. De igual manera se prepararon curvas para las dos técnicas de capacidad antioxidante ABTS y DPPH con el antioxidante Trolox en concentraciones de 0,125 - 2,000 mM.
- Precisión:
Precisión del Sistema de medición: se hicieron seis (6) preparaciones de un mismo estándar de concentración media: 0,500 mM de Trolox para las técnicas ABTS y DPPH; y de 200 $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico para Folin-Ciocalteu; y se analizaron según la metodología descrita para cada técnica

Precisión del método:

- Repetibilidad: se hicieron seis (6) preparaciones de una misma muestra de acuerdo al procedimiento implementado para cada una de las tres (3) técnicas por un mismo analista en el mismo día.
- Reproducibilidad: un segundo analista realizó otras seis (6) preparaciones de la misma muestra en un día diferente para ser comparadas con los resultados del primer analista.

3.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

Se estudiaron 4 factores con sus respectivos niveles como se describe en la Tabla No. 3. En la primera fase con los cinco (5) solventes seleccionados se determinó el solvente que extrae la mayor cantidad de compuestos fenólicos mediante un diseño irrestrictamente al azar con dos réplicas, manteniendo fijos los demás factores (temperatura, tiempo y relación soluto:solvente) en un nivel medio; El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significancia del 95% y la prueba de significancia de promedios de Tukey.

Tabla 3. Factores y niveles del proceso de extracción de fenoles

Factor	Niveles
a) Temperatura (°C)	20
	30
	40
b) Tiempo (min)	30
	60
	90
c) Relación soluto-solvente (w/v)	1:10
	1:15
	1:20
d) Solvente	1. Metanol 100 % 2. Metanol:Agua (70:30) 3. Isopropanol:Agua (60:40) 4. Etanol:Agua (80:20) 5. Acetona:Agua:Ac.Acético (70:29.5:0.5)

Después de encontrar el solvente con mejor rendimiento en la extracción de compuestos fenolicos, se procedió a realizar la segunda fase de la optimización con los tres factores restantes: Temperatura, tiempo de extracción y relación soluto-solvente mediante un diseño factorial 2^3 compuesto central rotatable + puntos estrella con 16 corridas y una réplica para un total de 32 ejecuciones experimentales, que se analizó

siguiendo la metodología de superficie de respuesta, usando el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI a un nivel de confianza del 95%.

3.6. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MATERIALES REGIONALES DE CACAO

Con base en el muestreo que se realizó y siguiendo las condiciones optimizadas para la extracción de fenoles asistida por ultrasonido, se evaluó el contenido de fenoles totales en el grano de cacao, y la capacidad antioxidante a través de los métodos: Folin-Ciocalteu, DPPH y ABTS; Como parte del establecimiento de la línea base de la caracterización fisicoquímica de compuestos no volátiles en granos de cacao regional. Los lotes del material vegetal que fueron utilizados para establecer la línea base del contenido inicial de fenoles y capacidad antioxidante mediante los métodos Folin-Ciocalteu, ABTS y DPPH, previo a cualquier tratamiento post cosecha corresponden a los materiales regionales CCL07, CCL10, CCL17, CCL35 y CCL93 de la zona del Consejo Comunitario Rescate Las Varas, Tumaco.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA MATERIA PRIMA

Se determinó el contenido de humedad, grasa total y proteína a cada material regional como se observa en la Tabla No. 4.

Tabla 4. Análisis bromatológico

CACAO REGIONAL LOTES					
PARAMETRO	CCL07	CCL10	CCL17	CCL35	CCL93
HUMEDAD	33,75%	34,11%	35,08%	36,74%	37,71%
GRASA TOTAL BASE SECA	31,77%	37,43%	44,77%	38,92%	49,88%
PROTEINA BASE SECA	14,45%	14,34%	13,67%	14,02%	14,09%

Los contenidos de grasa en base seca, indican una gran variabilidad respecto al valor promedio reportado en la literatura que corresponde a un 50% de grasa. Los valores bajos encontrados pueden llegar a ser una ventaja ya que esto permitiría la migración de los fenoles hacia el agente extractor debido a una disminución de la barrera lipídica (Rosso y Toro, 2011). El material de más bajo contenido de grasa lote CCL07 presenta uno de los más altos contenidos de fenoles (ver Tabla No.11); esta característica puede deberse a la ventaja antes mencionada.

4.2 IMPLEMENTACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES (MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU) Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (MÉTODOS DPPH Y ABTS).

Basados en los ensayos previos descritos en el literal 3.3 se implementaron las técnicas para fenoles totales y capacidad antioxidante.

En el caso particular de la técnica de Folin-Ciocalteu en donde se realizaron ensayos preliminares disolviendo el ácido gálico en metanol y en agua, se encontró como resultado que con el disolvente agua se obtiene un coeficiente de correlación adecuado y una mejor de correlación entre la concentración y las diluciones de la muestra de esta manera se logró una reducción en el consumo de metanol.

En cuanto al proceso de preparación de muestras utilizando el desengrasado, se realizó la comparación entre la muestra desengrasada y sin desengrasar presentando los siguientes resultados en mg de Acido Gálico / g de cacao, con su respectivo análisis de varianza:

Tabla 5. Preparación de muestra desengrasado vs sin desengrasar

ENSAYOS	SIN DEENGRASAR	DEENGRASADO
1	37,06	38,16
2	39,04	40,46
3	38,66	39,36
Promedio	38,25	39,33

Tabla 6. Análisis de varianza desengrasado vs sin desengrasar

ANÁLISIS DE VARIANZA DEENGRASADO					
Variación	SC	GL	CM	F	F crítico
Entre grupos	1,7	1,0	1,7	1,4	7,7
Dentro de los grupos	4,9	4,0	1,2		
Total	6,6	5,0			

Según el ANOVA no se presentan diferencias estadísticas significativas entre los dos procedimientos de preparación de muestras, por lo tanto por ahorro de tiempo de análisis y de solventes, se decide realizar la preparación sin el proceso de desengrasado.

De igual modo se hizo una comparación entre muestras centrifugadas y muestras sin centrifugar después del proceso de extracción por ultrasonido y midiendo su contenido de fenoles, encontrándose que no existen diferencias estadísticas significativas, según el ANOVA entre las medias de estos dos tratamientos, por tanto y para ahorrar tiempo y recursos, no se realizó la centrifugación de los extractos de las muestras. (Ver Anexo 1).

4.3 VERIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

En la Tabla No. 7 describen los parámetros estadísticos de la verificación de los métodos descritos.

Tabla 7. Parámetros estadísticos verificación

TECNICA	SELECTIVIDAD		LINEALIDAD R ²	RANGO LINEAL	PRECISION DEL SISTEMA (COEFICIENTE DE VARIACION)	PRECISION DEL METODO		TIEMPO DE REACCION
	MUESTRA CONTROL	BLANCO DEL EXTRACTO				REPETIBILIDAD (COEFICIENTE DE VARIACION)	REPRODUCIBILIDAD (ANALISTA 1 VS ANALISTA 2)	
ABTS	SIN INTERFERENCIA	0,001 < 1%	0,9963	0,125 mM-2,000 mM de Trolox	2,53	5,68%	SIN # SIGNIFICATIVAS	30 MIN
DPPH	SIN INTERFERENCIA	0,001 < 1%	0,9996	0,125 mM-2,000 mM de Trolox	0,663	3,06%	SIN # SIGNIFICATIVAS	30 MIN
FOLLIN	0,014	0,001 < 1%	0,9996	50-300 mg/ml de Acido Galico	2,08	2,08%	SIN # SIGNIFICATIVAS	60 MIN

Inicialmente se estableció la selectividad de los métodos, encontrándose para ABTS una absorbancia idéntica de la muestra Control con respecto a la solución ABTS de trabajo lo cual indica que no hay interferencia por reactivos y de igual manera para la muestra control de DPPH; en cuanto al blanco del extracto se encontró una absorbancia de 0,001 unidades para estas dos técnicas lo cual denota que no hay interferencia por la matriz de la muestra. (Ver Anexo 2).

Para la técnica de Folin- Ciocalteu, se encontró interferencia por los reactivos con un valor de 0,014 unidades de absorbancia. Dicha interferencia se controló mediante la elaboración de un blanco preparado con una mezcla de los reactivos y agua en las mismas proporciones utilizadas en la técnica. El blanco del extracto presentó una absorbancia de 0,001 unidades, lo cual indica que no hay interferencia por la matriz de la muestra para esta técnica. (Ver Anexo 2).

Con los valores mostrados en el rango se construyeron las curvas de calibración de los tres métodos. Es de destacar que se unificó una misma curva de calibración del antioxidante Trolox para las técnicas de ABTS y DPPH. La linealidad para los tres métodos presenta unos valores de coeficiente de correlación los cuales están por encima del valor mínimo aceptable para las técnicas de ultravioleta visible. (Como criterio de aceptación de la linealidad a partir de la curva de calibración se consideró $R^2 > 0.99$). (Dafau et al., 2010; ICH,2005). (Ver Anexos 3, 4 y 5).

La precisión del sistema medida con 6 repeticiones de un estándar de concentración media, indica que los tres métodos cumplen con este criterio, puesto que los valores hallados de coeficiente de variación son estadísticamente aceptados para la técnica analítica espectrofotometría UV-VIS. (Dafau et al., 2010; ICH,2005). (Ver Anexos 3, 4 y 5).

La precisión del método los datos estadísticos indican que no existen diferencias significativas entre los promedios de resultados para los dos analistas, por lo tanto los métodos son reproducibles. De igual manera se evaluó la repetibilidad con porcentajes del coeficiente de variación aceptables lo cual indica que los métodos son repetibles y

en general se puede afirmar que estos tres métodos son precisos. (Ver Anexos 6, 7 y 8).

También se estudió el tiempo de reacción adecuado para realizar las lecturas de cada análisis monitoreando la absorbancia a diferentes intervalos desde el inicio de la reacción. De esta manera se pudo concluir que a los 30 minutos de reacción se presenta la mayor estabilidad en las lecturas DPPH (ver Anexo 9), por lo tanto se establece este tiempo de reacción, como el apropiado para esta técnica. En cuanto a ABTS se encontró que a los 30 minutos se da el mayor descenso en la absorbancia, considerando este punto como el apropiado para registrar la lectura teniendo en cuenta las referencias de la literatura científica para ésta técnica, sin embargo como se aprecia en los datos del Anexo 10, la absorbancia sigue descendiendo a medida que aumenta el tiempo.

En cuanto a la técnica de Folin- Ciocalteu se consiguió reducir considerablemente el tiempo de reacción, ya que incrementando la cantidad de reactivo de carbonato de sodio al 7.5% de 1500 a 2000 μL se logró disminuir el tiempo a solo una hora cuando anteriormente se necesitaban dos horas de reacción para lograr la estabilidad. Este resultado se convierte en una gran ventaja, ya que en las posteriores determinaciones se minimiza considerablemente el tiempo de análisis. (Ver Anexo 11).

La implementación de las técnicas para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante por los métodos Folin-Ciocalteu, ABTS y DPPH condujo a la elaboración de sus respectivos protocolos que se muestran en los Anexos 16, 17 y 18, respectivamente.

4.4 OPTIMIZACIÓN DE LOS FACTORES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES POR ULTRASONIDO

4.4.1 SELECCIÓN DEL SOLVENTE

En la primera fase se determinó el solvente más adecuado mediante un diseño irrestrictamente al azar usando 5 solventes y 2 réplicas por cada uno.

El análisis de varianza de la primera fase mostró diferencias significativas entre los tratamientos (tipo de solvente) a un nivel de significancia de 95%. La prueba de significancia de promedios de Tukey muestra cuatro (4) grupos diferenciados, indicando que el tratamiento correspondiente a la mezcla de solventes Acetona:Agua:AcidoAcético (70:29,5:0,5), extrae la mayor cantidad de fenoles comparado con los demás y por tanto fue el elegido para realizar la extracción de fenoles, como se ve en la Tabla No. 8.

Tabla 8. Prueba de Tukey para tipo de solvente

PRUEBA DE TUKEY		
Solvente	mg AG/g cacao	Grupos
Acetona:Agua :AcidoAcético	33,77	a
Metanol:Agua	25,23	b
Isopropanol: Agua	24,85	b
Etanol:Agua	15,81	c
Metanol 100%	4,31	d

La solubilidad de los compuestos polifenólicos de los granos de cacao es afectada por la polaridad del solvente, se encontró que dichos compuestos son poco solubles cuando se emplean los solventes puros (metanol) como se evidencia en los resultados indicados en la tabla No. 8. Gil (2012) determinó que se obtienen mejores resultados de extracción cuando se combinan diferentes solventes con polaridades distintas, esto concuerda con la publicación de Wollgast (2004) quien en su estudio para la determinación de fenoles en cacao analizó varios solventes, encontrando que el más adecuado es la mezcla Acetona:Agua:AcidoAcético (70:29,5:0,5). Dado que los compuestos polifenólicos presentan cierta acidez, la cual es proporcionada por los grupos OH en su estructura, se infiere que por dicho motivo el único solvente acidificado de los evaluados, fue el que mejor extrajo dichos compuestos.

Raga et al. (2014) en su estudio sobre extracción ultrasónica de compuestos fenólicos en papaya, determinaron que el mejor sistema de solventes para la extracción es acetona:agua:ácido acético (70:28:2%v/v/v), sólo evidenciándose una pequeña variación en la proporción del ácido. En dicho trabajo el empleo de metanol arrojó una baja recuperación de los analitos, al ser empleado éste como único solvente de extracción, muy similar a los resultados del presente estudio.

4.4.2 NIVELES ÓPTIMOS DE TEMPERATURA, TIEMPO Y RELACIÓN SOLUTO SOLVENTE.

Se optimizó la etapa de extracción mediante la segunda fase de la optimización, del diseño experimental central compuesto factorial 2^3 compuesto central rotatable + puntos estrella, el cual fue evaluado mediante la metodología de superficie de respuesta, con lo cual se ha conseguido reducir el consumo de tiempo, dinero, energía, reactivos y la generación de residuos, al minimizar el número de experimentos necesarios para la obtención de los resultados óptimos.

Los resultados del diseño compuesto central se procesaron mediante un análisis de regresión múltiple, obteniéndose una ecuación polinomial de segundo orden con los

coeficientes de regresión del intercepto lineal, cuadrático y los términos de interacción del modelo:

$$\text{Fenoles totales} = 24,79 + 0,06 \cdot T + 0,29 \cdot t - 0,45 \cdot R.S/S - 0,00014 \cdot T^2 - 0,0029 \cdot T \cdot t + 0,015 \cdot T \cdot R.S/S - 0,0012 \cdot t^2 - 0,0013 \cdot t \cdot R.S/S + 0,012 \cdot R.S/S^2$$

T = Temperatura

t = Tiempo

R.S/S = Relación soluto/solvente

El coeficiente de determinación R^2 es de 82,7%, este valor fue considerado suficientemente alto para explicar la dependencia de la variable de respuesta de acuerdo a los factores analizados. Algunos autores indican que el valor de R^2 de al menos el 80% es suficiente para explicar la variabilidad de un modelo. (Prasad and Nath, 2002).

El análisis de varianza del diseño indica seis (6) efectos que influyen en la variable de respuesta correspondiente a los efectos principales de los tres factores en estudio y los efectos de tres interacciones: temperatura/tiempo, temperatura/relación soluto:solvente y tiempo:tiempo, como se aprecia en la Tabla No. 9 y el Diagrama de Pareto siguientes:

Tabla 9. Análisis de Varianza para Diseño compuesto central

Fuente	S.C.	GL	C.M.	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	25,4295	1	25,4295	15,25	0,0008
B:Tiempo	39,9841	1	39,9841	23,98	0,0001
C:Relación S/S	54,8865	1	54,8865	32,92	0,0000
AA	0,0038299	1	0,0038299	0,00	0,9622
AB	12,1278	1	12,1278	7,27	0,0132
AC	8,86551	1	8,86551	5,32	0,0309
BB	20,062	1	20,062	12,03	0,0022
BC	0,604506	1	0,604506	0,36	0,5533
CC	1,68051	1	1,68051	1,01	0,3263
Error total	36,685	22	1,6675		
Total (corr.)	211,985	31			

Diagrama de Pareto Estandarizada para fenoles totales

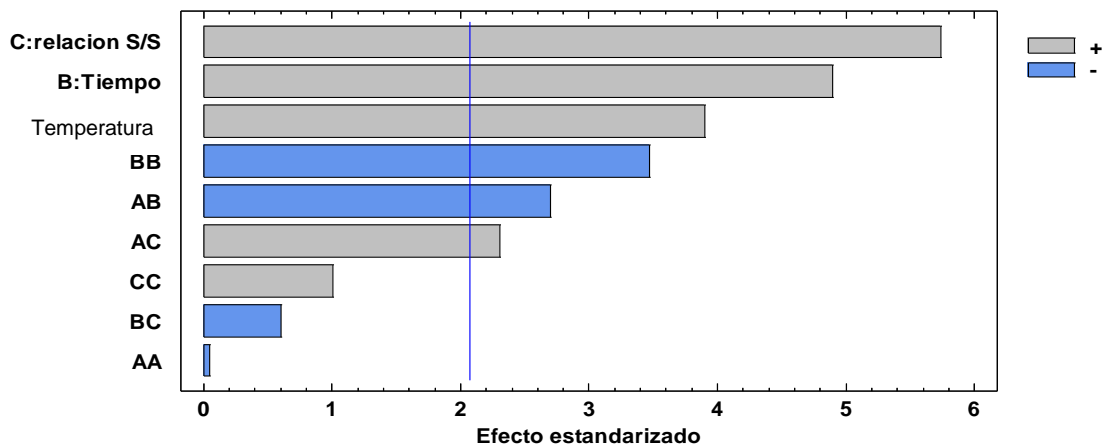


Figura 10. Diagrama de Pareto Estandarizado para fenoles totales

En la figura No. 11 de efectos principales se puede apreciar como el aumento de la relación soluto/solvente y el aumento de la temperatura son directamente proporcionales con la variable de respuesta; sin llegar a un punto de inflexión en estos dos casos; sin embargo para el factor tiempo se observa un aumento progresivo y posteriormente un descenso en la variable de respuesta, lo cual indica que en este punto de inflexión es óptimo para este factor.

Roso y Toro (2011) en su estudio sobre la optimización de la extracción de fenoles en almendra de mango, explican que el aumento en el contenido de fenoles con el incremento de la temperatura se debe al aumento de la solubilidad de estos últimos en el solvente. Además, el calentamiento tiene la capacidad de ablandar los tejidos vegetales, debilitar la integridad de la pared celular y por lo tanto favorecer la liberación de compuestos fenólicos. (Spigno et al 2007).

Gráfica de Efectos Principales para fenoles totales

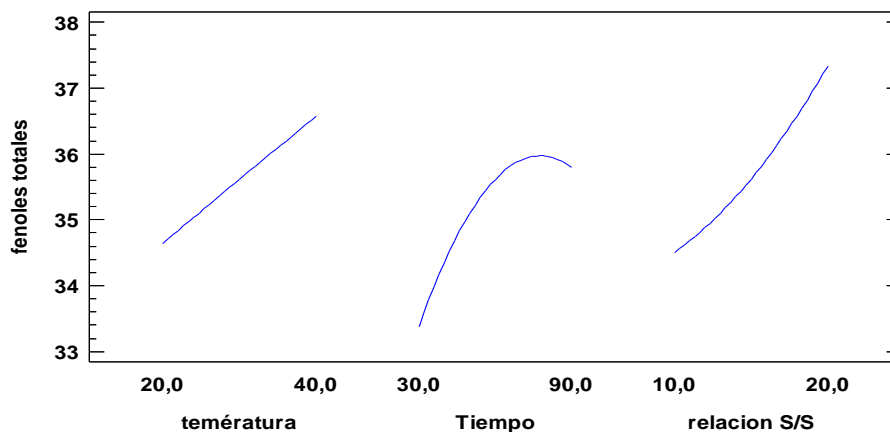


Figura 11. Efectos principales para Fenoles totales

En el estudio de Gil (2012) se evaluó el tiempo de extracción por ultrasonido para determinar fenoles en cacao, llegando hasta los 60 minutos sin encontrar un punto de inflexión; en el presente estudio se decidió evaluar hasta los 90 minutos hallándose satisfactoriamente un punto de inflexión o punto óptimo para el factor tiempo que corresponde aproximadamente a los 75 minutos.

La presencia del punto de inflexión para el factor tiempo se explica considerando la degradación que pueden sufrir los compuestos polifenólicos con un tiempo de sonicación prolongado, lo cual se puede deber al fenómeno de cavitación que generan grandes presiones y temperaturas cuando colapsan las burbujas producidas, siendo capaces de producir ruptura de enlaces. Arroyo y Flores (2001) en su estudio sobre degradación ultrasónica de contaminantes orgánicos atribuyen a éste fenómeno su acción de termólisis y de las reacciones por formación de radicales que derivan en la degradación química de contaminantes en aguas residuales.

En cuanto a la relación soluto/solvente y su influencia en la variable, dicha proporcionalidad puede explicarse por una saturación del solvente cuando la cantidad de solvente es más baja, condición que mejora al aumentar la cantidad de solvente por gramo de sólido y se evidencia en una mayor extracción de fenoles.

En la figura No. 12 de interacciones se puede apreciar que para la relación temperatura / tiempo (AB), el menor valor del tiempo estudiado produce un mayor efecto de la temperatura con respecto a la extracción de fenoles, lo cual está acorde con el efecto de disminución de la variable de respuesta con un tiempo elevado de 90 minutos (ver figura No. 12 efectos principales). Para la interacción temperatura / relación soluto:solvente (AC) se observa un influencia contraria, puesto que con la relación soluto:solvente más elevada, se evidencia un impacto más pronunciado; y para la interacción tiempo / relación soluto:solvente (BC) se observa un efecto equivalente, tanto para la menor como para la mayor temperatura, con un punto de inflexión que corresponde con lo evidenciado en el efecto principal del tiempo.

Gráfica de Interacción para fenoles totales

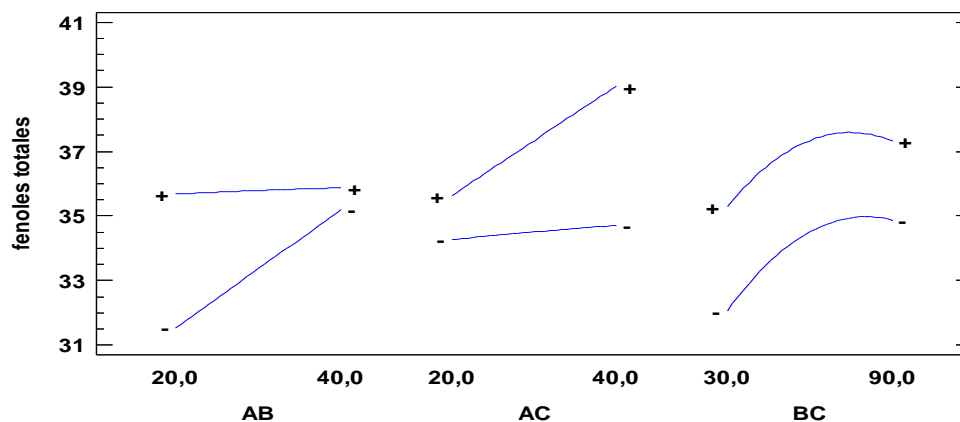


Figura 12. Interacciones para fenoles totales

A continuación se muestran las gráficas de superficie de respuesta; la figura No 13 corresponde a la temperatura vs. tiempo manteniendo fija la relación soluto/solvente; se puede observar que la cantidad de fenoles extraídos disminuye con temperaturas bajas y tiempos cortos de extracción, lo mismo ocurre para altas temperaturas y tiempo extensos, sin embargo para un tiempo superior a 60 minutos y una temperatura superior a 40°C se presenta la mayor cantidad de fenoles extraídos. Este comportamiento puede ser explicado por el efecto principal del factor tiempo que genera una disminución del contenido de fenoles con tiempos demasiado extensos. En el anexo 12 se puede observar el diagrama de contorno para esta superficie de respuesta.

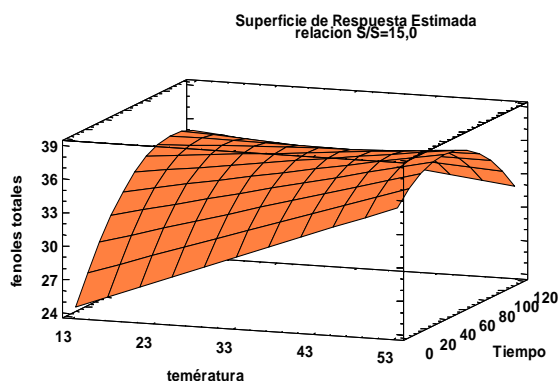


Figura 13. Superficie de respuesta Temperatura vs. Tiempo

La figura No 14 muestra la superficie de respuesta de la temperatura vs. relación soluto/solvente manteniendo fijo el tiempo, se puede evidenciar que a temperatura y relaciones soluto: solvente elevadas, se extrae la mayor cantidad de fenoles, esta tendencia se puede explicar por el efecto lineal de los factores relación soluto / solvente y temperatura. En el anexo 12 se puede observar el diagrama de contorno para esta gráfica de superficie de respuesta.

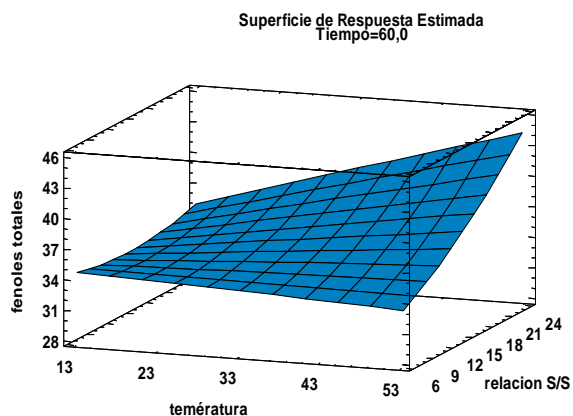


Figura 14. Superficie de respuesta Temperatura vs. Relación soluto/solvente

Y la figura No. 15 de tiempo vs. relación soluto/solvente manteniendo fija la temperatura, indica que entre 60-90 minutos se da la mayor extracción de fenoles, lo cual es causado por el efecto principal del factor tiempo y su punto de inflexión, además del efecto lineal de la relación soluto/solvente. En el anexo 12 se puede observar el diagrama de contorno para esta superficie de respuesta

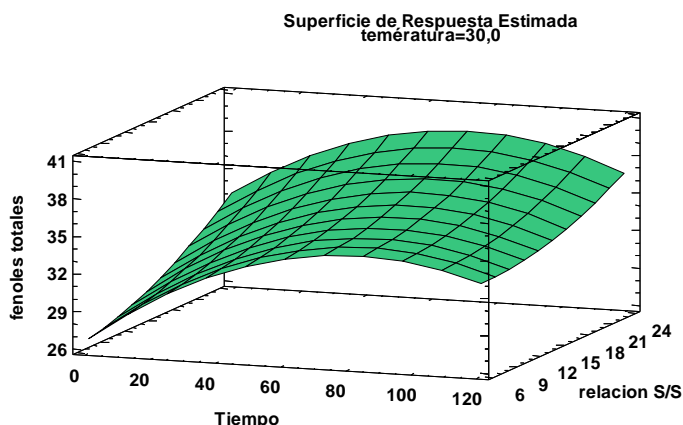


Figura 15. Superficie de respuesta Tiempo vs. relación soluto/solvente

Al optimizar la combinación de los niveles de los factores que maximiza la variable de respuesta se encontró que los valores óptimos son los siguientes:

Tabla 10. Valores óptimos

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	13,1821	46,8179	39,3059
Tiempo	9,54622	110,454	74,4634
Relación S/S	6,59104	23,409	22,7923

La utilización del diseño de superficie de respuesta permitió la posibilidad de optimizar las condiciones con el fin de obtener un mayor rendimiento; trabajando con la herramienta de optimización del programa STATGRAPHICS® se obtiene la respuesta ideal, es decir la máxima predicha con los factores óptimos la cual corresponde a 40,3 mg Acido Gálico / g licor de cacao. Lo anterior es muy satisfactorio desde el punto de vista económico, ya que determinaron las mejores condiciones y consolidan un método eficiente, basado en criterios de sostenibilidad, dado el menor consumo de energía, pues las metodologías tradicionales de maceración o agitación con solventes pueden tomar hasta 48 horas.

4.5 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES PRESENTES EN EL GRANO DE CACAO NARIÑENSE Y DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

Se cuantificaron los fenoles totales presentes en el grano de cacao sin fermentar de materiales de la zona del Consejo Comunitario Rescate Las Varas, Tumaco-Nariño, por el método Folin-Ciocalteu y se determinó la capacidad antioxidante a través de los métodos DPPH y ABTS; preparando las muestras bajo las condiciones de extracción óptimas encontradas. De esta manera se determinó la línea base del contenido inicial de estos compuestos en cinco (5) materiales regionales de Nariño. (Ver Tabla No. 11)

A continuación se muestran los resultados de la aplicación de los métodos Folin-Ciocalteu, ABTS y DPPH para cada material, expresados como la media \pm desviación estándar y en base seca. Los datos encontrados y su análisis estadístico para las tres (3) técnicas se encuentran en los Anexos 13, 14 y 15.

Tabla 11. Fenoles totales en material vegetal y capacidad antioxidante por ABTS y DPPH.

Material	Fenoles Totales mg AG/g	ABTS mmol Trolox/g	DPPH mmol Trolox
CCL17	56.33 \pm 1.19 A	0.550 \pm 0.001 A	0.460 \pm 0.010 A
CCL07	50.28 \pm 2.28 B	0.518 \pm 0.028 B	0.401 \pm 0.001 C
CCL35	50.06 \pm 1.45 B	0.550 \pm 0.029 A	0.410 \pm 0.058 B
CCL10	43.75 \pm 0.87 C	0.459 \pm 0.051 C	0.325 \pm 0.039 D
CCL93	35.34 \pm 0.70 D	0.372 \pm 0.018 D	0.318 \pm 0.007 E

El contenido de fenoles depende de la variedad del grano de cacao empleado, origen geográfico, condiciones de cosecha, condiciones de postcosecha procesamiento y almacenaje teniendo en cuenta lo reportado por Wollgast y Anklam, 2000.

El material CCL 17 presenta el mayor contenido de fenoles y capacidad antioxidante de acuerdo a los métodos ABTS y DPPH (ver Tabla No.11) ; en comparación con el lote CCL 93 que presenta el contenido más bajo de fenoles y capacidad antioxidante, en este caso coinciden los altos valores de fenoles junto con los mayores datos de la capacidad antioxidante y esto se debe a que el grupo de moléculas que conforman la estructura del polifenol tiene propiedades de ceder electrones con facilidad para generar una respuesta antioxidante. Sin embargo Padilla, F (2008), en su estudio afirma que en dependencia de los tipos de fenoles presentes en las muestras, por su estructura pueden presentar mayor actividad antioxidante que otros y que no existe ninguna correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante.

En el presente estudio se encontró que existe un correlación directa entre el contenido de fenoles y capacidad antioxidante, aunque se presentaron ciertas divergencias para los lotes CCL07 y CCL35.

Zapata et al 2013, en su trabajo denominado “Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano” reporta valores de contenido de fenoles totales en un intervalo de 21,69 a 38,64 mg AG/g en granos sin fermentar, estos valores indican que los materiales de la región de Tumaco presentan valores superiores de contenidos de fenoles. En el mismo trabajo mencionado, Zapata et al (2013), indican valores de capacidad antioxidante por el método DPPH en un rango de 0,252 a 0,368 mmol de Trolox/g cacao, los cuales son considerablemente menores a los encontrados en el presente estudio para los materiales regionales de Tumaco.

En el estudio realizado por Jonfia-Eisen et al., (2008) con semillas de diferentes variedades clonales de cacao, los autores reportaron contenidos de fenoles totales de 70-80 mg ÁG/g, superiores a los encontrados en este estudio.

Barberán et al (2007) encontraron que el contenido de los fenoles totales (ácido gálico) en los granos de cacao seco correspondientes a las variedades criolla, trinitaria y forastera eran diferentes entre sí. También encontraron diferencia en el contenido de fenoles, cuando se evalúa una misma variedad procedente de otras regiones de cultivo. Finalmente evaluaron el contenido de fenoles en cada una de las etapas del beneficio del cacao y encontraron que los granos secos sin fermentar tenían cerca de 7.5 g AG/100g , los tostados sin fermentar 5 g AG/100g, los secos fermentados 4 g AG/100 gramos y los tostados fermentados cerca de 2 g AG/100g (Tomas-Barberán, Cienfuegos-Jovellanos et al. 2007).

El contenido de fenoles totales en granos de cacao no fermentados y secados de diferentes países es variable, Costa de Marfil variedad Forastero 81,5 ±18,2 mg AG/g, Colombia variedad Amazon 81,4 ± 3,7 mg AG/ g, Ecuador variedad Amazon, Trinitario, Canelo y Amazon híbrido 84,2 ± 8,7 mg AG/ g, Venezuela variedad Trinitario 64,3 ± 5,6 mg AG/g, y Perú variedad Criollo 50 mg AG/100 g. (Chaves et al 2013).

Al comparar los resultados de este estudio con otros materiales vegetales se evidencia que el cacao sin fermentar presenta un contenido de fenoles totales menor que el tamarindo (94,50 ± 4,9 mgEAG/g), el aguacate (88,20 ± 2,2 mgEAG/g), y la semilla de uva (66,81 mgEAG/g); mientras que presenta un contenido superior a la guayaba (20mgEAg/g) y la papaya (7 mgEAG/g) .(Pitchaon et al., 2009; Bucic-Kojic et al., 2006; Herrera et al., 2008); La actividad antioxidante reportada para algunas frutas y vegetales en mmol Trolox/g: zuchinni: $2,86 \times 10^{-3}$; aguacate: $2,22 \times 10^{-3}$; rábano rojo: $2,22 \times 10^{-3}$; cereza: $2,69 \times 10^{-3}$; higos: $2,47 \times 10^{-3}$; kiwi: $2,28 \times 10^{-3}$ y pera: $2,19 \times 10^{-3}$ (Pellegrini et al., 2009). Cabe resaltar que los diversos materiales regionales de cacao de Nariño tienen actividad antioxidante y contenido de fenoles totales superiores a un buen número de clones de cacaos colombianos, lo cual representa una ventaja comparativa con respecto a otras regiones.

CONCLUSIONES

- Se optimizó la etapa de extracción utilizando un diseño estadístico de experimentos, con lo cual se consiguió minimizar la etapa de preparación de la muestra gracias al uso de la técnica de ultrasonido y así consolidar un método de extracción eficiente y económico, al reducir el tiempo de análisis, el consumo de energía, reactivos y la generación de residuos, en comparación con las metodologías tradicionales.
- Se verificaron los métodos analíticos ABTS, DPPH y Folin-Ciocalteu, al establecer los parámetros: Selectividad, Linealidad y Precisión, cuyos valores estadísticos están acordes a los criterios aceptados para dichos parámetros.
- La mezcla de solventes Acetona:Agua:Ac.Acético, (70:29.5:0.5) de acuerdo al análisis estadístico, demostró ser la que extrae la mayor cantidad de fenoles de muestras de cacao.
- Los resultados obtenidos del análisis estadístico del diseño central compuesto confirmaron que todos los factores considerados: temperatura, tiempo y relación soluto/solvente, tienen una influencia significativa sobre la cantidad de fenoles totales extraídos.
- Las condiciones óptimas del método de extracción de compuestos fenólicos por ultrasonido fueron: temperatura de 39,3°C, Relación soluto/solvente 1g/22,8 mL, y tiempo de 74,5 min.
- Se encontró que el material CCL 17 presenta el más alto contenido de fenoles y capacidad antioxidante; mientras que CCL 93 presenta los más bajos contenidos de estas variables, esto se puede atribuir a la variabilidad genética presente en los materiales regionales estudiados.

RECOMENDACIONES

Simplificar la extracción de compuestos fenólicos utilizando las modificaciones de la preparación de la muestra, omitiendo las operaciones de desengrasado y centrifugación.

Emplear la técnica de HPLC preparativa, con la finalidad de separar los compuestos fenólicos y poder determinar con exactitud la actividad antioxidante de cada uno.

Determinar la presencia y cuantificar metilxantinas, catequinas y procianidinas por HPLC, para establecer el perfil de dichos compuestos en los extractos obtenidos de las muestras regionales analizadas.

Aprovechar el recurso encontrado de compuestos de actividad biológica de manera significativa, minimizando sus pérdidas durante las etapas de post cosecha e industrialización para mejorar la calidad del cacao; contribuyendo así al bienestar económico y social de las comunidades de cacaocultores y de la sociedad en general, dados los beneficios que los productos fabricados a partir de este cacao, pueden representar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Álvarez, C., Tovar, L., García, H., Morillo, F., Sánchez, P., Girón, C., & De Farias, A. (2010). Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) usando dos tipos de fermentadores. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 76-87.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.

Arroyo, J., y Flores, J. (2001). Degradación ultrasónica de contaminantes orgánicos. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 4(2), 3-14.

Ávila Castañeda, I. M. Estudio de los compuestos polifenólicos con énfasis en flavonoides del hongo *Lentinula edodes* y determinación de la actividad antioxidante”/“Study of the polyphenolic compounds with emphasis on flavonoids of mushroom *Lentinula edodes* and determination of the antioxidant activity (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).

Azuola, R. y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido. *Tecnología En Marcha*, 20(4), 30–40.

Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerdá, B., ... & Pasamar, M. A. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3926-3935.

Bayard, V., Chamorro, F., Motta, J., & Hollenberg, N. K. (2007). Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama, 4(1), 53-8.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in enzymology*, 186, 343-35.

Bravo, L., Abia, R., Eastwood, M. A., & Saura-Calixto, F. (1994). Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *British Journal of Nutrition*, 71(06), 933-946.

Bucheli, P., Rousseau, G., Alvarez, M., Laloi, M., & McCarthy, J. (2001). Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao L.* seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 5046-5051.

Casa Luker. Nuevo enfoque de la cacaocultura Colombiana, (2011). Disponible en: <http://www.appcacao.org/descargas/seminario2011/Cacao%20Colombiano.pdf>.

Chanatásig Vaca, C. I. (2004). Induction to somatic embryogenesis in superior clones of cacao (*Theobroma cacao L.*), presenting resistance to fungal diseases (No. Thesis C454i). CATIE, Turrialba (Costa Rica).

Cherniack, E. P. (2011). Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition*, 27(6), 617-623.

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107-110.

Creus, E. V. A. G. (2004). Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito farmacéutico*, 23, 80-84.

Chávez Rivera, R. E., y Ordoñez, E. S. (2013). Fenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento. *Revista ECIPerú*, 10 (1), 41-50.

Chemat, F., H. Zill y K. Muhammed (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18, 813-835. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225.

Counet, C., Callemien, D., & Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, 98 (4), 649-657.

De Jesús Morales, J., García, A., & Méndez, E. (2012). ¿ Qué sabe usted acerca de... Cacao?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(4), 79-81.

Del Fresno, A. M. V., & Hernández-Agero, T. O. (2005). Cacao¿ Alimento y medicamento?. *Farmacia profesional*, 19(2), 68-72.

Deng, J., Cheng, W., & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430-1435.

Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Scheirlinck, I., Beheydt, B., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2013). Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3420-3432.

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., ... & Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la

medición: "aspectos generales sobre la validación de métodos". Guía técnica, (1), 21-49.

Fedecacao, (2013), PRODUCCIÓN DE CACAO SUBIRÁ EL 12% EN 2013. Disponible en: <http://www.fedecacao.com.co/site/index.php/1nov-novedades/5mayo-noticias/4309-2017-01-27-nota1>.

Faborode, M. O., Favier, J. F., & Ajayi, O. A. (1995). On the effects of forced air drying on cocoa quality. *Journal of Food Engineering*, 25(4), 455-472.

García, M., Quintero, L. F. M., & Restrepo, L. A. M. (2012). Análisis comparativo de competitividad de las cadenas productivas de cacao de Colombia y Ecuador. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 29(1), 99-112.

Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., ... & Ferri, C. (2008). Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *The Journal of nutrition*, 138(9), 1671-1676.

Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., & Prior, R. L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4057-4061.

Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887-1892.

Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R., & Schmitz, H. H. (1999). Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 490-496

Haslam, E., & Cai, Y. (1994). Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports*, 11, 41-66.

Heiss, C., Sies, H., Schewe, & Kelm, M. (2005). Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 304S-312S.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

ITC. 2001. Cocoa; A Guide to Trade Practices. International Trade Centre. Product and Market Development. Geneva. 180 p

ICH. 2005 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements or Registration of Pharmaceuticals or Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline.

Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). New York. Food and Drug Administration.

Jonfia-Essien, W.A., West, G., Alderson, P.G. and Tucker, G. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry* 108, 1155-1159.

Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 51(18), 5207-5213

Keen, C. L., Holt, R. R., Oteiza, P. I., Fraga, C. G., & Schmitz, H. H. (2005). Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 298-303.

Khanbabaee, K., & van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.

Kyi, T. M., Daud, W. R. W., Mohammad, A. B., Wahid Samsudin, M., Kadhum, A. A. H., & Talib, M. Z. M. (2005). The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *International journal of food science & technology*, 40(3), 323-331.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691-693.

Larrea Posadas, J. (2012). Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario. Tesis Fin de Master. Retrieved from <http://academicae.unavarra.es/handle/2454/6531> .

Liu, W.-h., J.-z. Zhao, Z.-y. Ouyang, L. Soderlund, and G.-h. Liu. (2005). Impacts of sewage irrigation on heavy metal distribution and contamination in Beijing, China *Environment International* , 31(6), 805-812.

Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica (Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico)*. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, 54-57.

Martínez Navarro, B. E. (2015). Análisis bromatológico del carambolo (*Averrhoa carambola* L.) y determinación de su capacidad antioxidante, Tesis. Universidad Veracruzana. México D.F.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.

Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.

- Okezie I. (2002). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research*. Vol 523 (24). 2002. 280 p.
- Ortiz de Bertorelli, L., Graziani de Fariñas, L., & Rovedas, G. (2009). Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía tropical*, 59(2), 119-127.
- Osman, H., Nasarudin, R., & Lee, S. L. (2004). Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chemistry*, 86(1), 41-46.
- Padilla, F. C., Rincón, A. M., & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de fenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 58(3), 303.
- Paladino, S. C. (2008). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.
- Pallares-Pallares, A., Perea-Villamil, J. A., & López-Giraldo, L. J. (2016). Impacto de las condiciones de beneficio sobre los compuestos precursores de aroma en granos de cacao (*Theobroma cacao* L) del clon CCN-51. *Respuestas*, 21(1), 120-133.
- Pan, Z.; Qu, W.; Ma, H.; Atungulu, G.G., & McHugh, T.H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrason Sonoch*, 18(5), 1249-1257.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85(2), 267-273.
- Perea-Villamil, J. A., Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(2), 128-134.
- Prasad, K., & Nath, N. (2002). Effect of pre-treatments and clarificants on sugarcane juice characteristics. *Asian Journal of Chemistry*, 14(2), 723
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rimbach, G., Melchin, M., Moehring, J., & Wagner, A. E. (2009). Polyphenols from Cocoa and Vascular Health-A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(10), 4290-4309.
- Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazaru, S. A., Rémésy, C., Scalbert, A., & Will, G. (2002). Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *American Journal Clinical Nutrition*, 76, 1106-10

Rivera, R. E. C., & Gómez, E. S. O. (2013). Fenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. ECIPeru: Revista del Encuentro Científico Internacional, 10(1), 42-50.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. Journal of agricultural and food chemistry, 51(10), 2866-2887.

Rusconi, M., Pinorini, M. T., & Conti, A. (2013). Proanthocyanidins of Cocoa: Bioavailability and Biological Activities. En K. G. Ramawat, & J. M. Merillon (Edits.), *Natura Products* (págs. 2311-2332). Berlin: Springer- Verlag.

Quintero, G., & Andrés, J. (2012). Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. (Tesis de Maestría).Medellin: Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmaceutica; 2012.

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los fenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

Quiroz-Reyes, C. N., Aguilar-Mendez, M. A., Ramírez-Ortíz, M. E., & Jesús, R. D. (2013). Estudio comparativo entre las técnicas de ultrasonido y maceración para la extracción de fenoles del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*). *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(1), 11-18.

Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094-1117.

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208.

Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M. Á., Muguera, B., Ramón, D., & Ríos, J. L. (2010). Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43(6), 1614-1623.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158

SOIC, Ministerio de agricultura y desarrollo rural, 2014. Disponible en: <http://sioc.minagricultura.gov.co>

Tannenbaum, G. (2004). Chocolate: A marvelous natural product of chemistry. *Journal of Chemical Education*, 81(8), 1131.

Vidavalur, R., Otani, H., Singal, P. K., & Maulik, N. (2006). Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Experimental & Clinical Cardiology*, 11(3), 217-225.

Villar del Fresno, A, & Ortega, T. (2005). Cacao ¿Alimento y medicamento?. *Farmacia profesional*, 19(2), 68-72.

Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R. y Van Breemen, R. B. (2002). An LC. MS method for analysing total resveratrol in grape juice, cranberry juice and wine. *Journal of agricultural and food chem.* 48, 253,256.

Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

WILLIAMS, Christine A.; 2004 GRAYER, Renée J. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*, , vol. 21, no 4, p. 539-573.

Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447.

Wollgast, J. (2005). 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 (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Giessen).

Yilmaz, Y. and R. T. Toledo (2004). "Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(2): 255-260.

Zapata Bustamante, S., Tamayo Tenorio, A., & Alberto Rojano, B. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 391-404.

ANEXOS

Anexo A. Datos de muestras centrifugadas vs. muestras sin centrifugar

Réplica	FENOLES TOTALES mg A.G./g licor	
	SIN CENTRIFUGAR	CENTRIFUGADA
1	22,56	22,76
2	23,56	23,44
3	23,74	23,64
Promedio	23,29	23,28

ANALISIS DE VARIANZA CENTRIFUGACION

ANÁLISIS DE VARIANZA PRUEBA CENTRIFUGACION					
Variación	SC	gl	CM	F	F crítico
Entre grupos	6,7E-05	1	6,7E-05	0,00022	7,71
Dentro de los grupos	1,23	4	0,31		
Total	1,23	5			

Anexo B. Selectividad métodos abts, dpph y folin-ciocalteu

Selectividad ABTS

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL734,0	Comments
1	CONTROL	Unknown		*****	0.641	
2	BCO EXTRACT	Unknown		*****	0.001	
3						

Selectividad DPPH

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL517,0	Comments
1	DPPH 80 μ M DIA 1	Unknown		*****	0.909	
2	CONTROL2	Unknown		*****	0.908	
3	BLANCO EXTRACT 2	Unknown		*****	0.001	
4						

Selectividad Folin-Ciocalteu

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL765,0	Comments
1	CONTROL	Unknown		*****	0,014	
2	BCO EXTRACTO AGUA	Unknown		*****	0.001	
3	BCO EXTRACTO CARBONATO	Unknown		*****	0.001	
4						

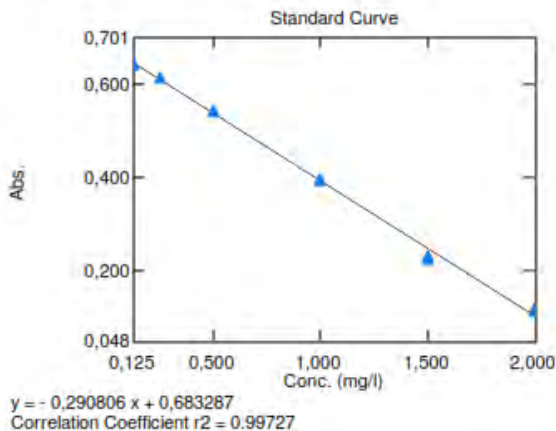
Anexo C. Linealidad y precisión del sistema abts

Reporte Fotométrico

File Name: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\Demo\ABTS\CURVA DE CALIBRACION ABTS.pho

[Wavelengths]
 Wavelength Name: WL734,0
 Wavelength: 734,00 nm

[Calibration Curve]
 Column for Cal. Curve: WL734,0
 Cal. Curve Type: Multi Point
 Cal. Curve Unit: mg/l
 Selected Wavelength: WL734,0
 Calibration Equation: $Abs = K1 * (Conc) + K0$
 Zero Interception: Not Selected



[Measurement Parameters(Standard)]
 Data Acquired by: Instrument
 Delay sample read: Disabled
 Repeat: Disabled

[Measurement Parameters(Sample)]
 Data Acquired by: Instrument
 Delay sample read: Disabled
 Repeat: Disabled

Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL734,0	Wgt.Factor	Comments
1	STD 1/1	Standard		0.125	0.644	1.000	
2	STD 1/2	Standard		0.125	0.645	1.000	
3	STD 2/2	Standard		0.250	0.616	1.000	
4	STD 3/1	Standard		0.500	0.543	1.000	
5	STD 3/2	Standard		0.500	0.543	1.000	
6	STD 4/1	Standard		1.000	0.394	1.000	
7	STD 4/2	Standard		1.000	0.395	1.000	
8	STD 5/1	Standard		1.500	0.225	1.000	
9	STD 5/2	Standard		1.500	0.230	1.000	
10	STD 6/1	Standard		2.000	0.116	1.000	
11	STD 6/2	Standard		2.000	0.112	1.000	
12							

PRECISION DEL SISTEMA ABTS	
STD 3 - 0,500 mM	ABSORBANCIA
1	0,495
2	0,490
3	0,476
4	0,473
5	0,465
6	0,468
DESVEST	0,012
PROMEDIO	0,478
%RSD	2,530

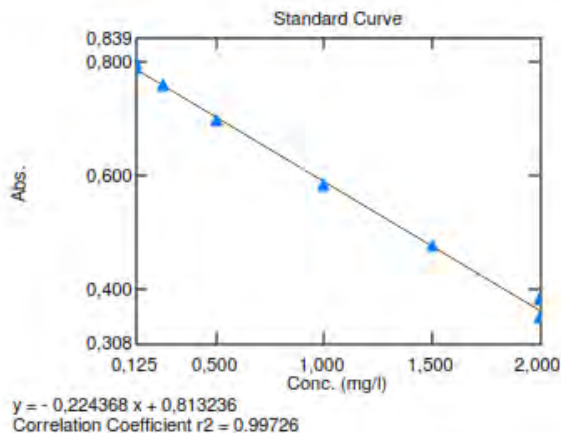
Anexo D. Linealidad Y Precision Del Sistema Dpph

Reporte Fotométrico

File Name: C:\Program Files\Shimadzu\UVPProbe\Data\Demo\DPPH\CURVA DE CALIBRACION DPPH 2.pho

[Wavelengths]
 Wavelength Name: WL517,0
 Wavelength: 517,00 nm

[Calibration Curve]
 Column for Cal. Curve: WL517,0
 Cal. Curve Type: Multi Point
 Cal. Curve Unit: mg/l
 Selected Wavelength: WL517,0
 Calibration Equation: $Abs = K1*(Conc) + K0$
 Zero Interception: Not Selected



[Measurement Parameters(Standard)]
 Data Acquired by: Instrument
 Delay sample read: Disabled
 Repeat: Disabled

[Measurement Parameters(Sample)]
 Data Acquired by: Instrument
 Delay sample read: Disabled
 Repeat: Disabled

Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL517,0	Wgt.Factor	Comments
1	STD 1/1	Standard		0.125	0.786	1.000	
2	STD 1/2	Standard		0.125	0.795	1.000	
3	STD 2/1	Standard		0.250	0.757	1.000	
4	STD 2/2	Standard		0.250	0.759	1.000	
5	STD 3/1	Standard		0.500	0.697	1.000	
6	STD 3/2	Standard		0.500	0.696	1.000	
7	STD 4/1	Standard		1.000	0.582	1.000	
8	STD 4/2	Standard		1.000	0.586	1.000	
9	STD 5/2	Standard		1.500	0.477	1.000	
10	STD 6/1	Standard		2.000	0.383	1.000	
11	STD 6/2	Standard		2.000	0.352	1.000	
12							

PRECISION DEL SISTEMA DPPH	
STD 3 - 0,500 mM	ABSORBANCIA
1	0,578
2	0,580
3	0,584
4	0,575
5	0,574
6	0,575
DESVEST	0,004
PROMEDIO	0,578
%RSD	0,663

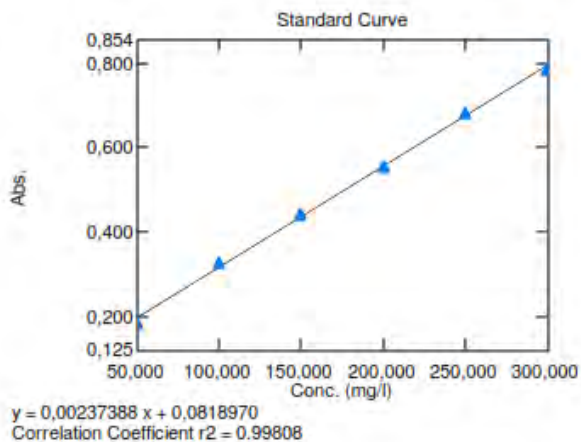
Anexo E. linealidad y precision del sistema folin-ciocalteu

Reporte Fotométrico

File Name: C:\Program Files\Shimadzu\UVProbe\Data\Demo\FOLIN\FOLIN CURVA DE CALIBRACION 3.pho

[Wavelengths]
 Wavelength Name: WL765,0
 Wavelength: 765,00 nm

[Calibration Curve]
 Column for Cal. Curve: WL765,0
 Cal. Curve Type: Multi Point
 Cal. Curve Unit: mg/l
 Selected Wavelength: WL765,0
 Calibration Equation: $Abs = K1*(Conc) + K0$
 Zero Interception: Not Selected



[Measurement Parameters(Standard)]
 Data Acquired by: Instrument
 Delay sample read: Disabled
 Repeat: Disabled

[Measurement Parameters(Sample)]
 Data Acquired by: Instrument
 Delay sample read: Disabled
 Repeat: Disabled

Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL765,0	Wgt.Factor	Comments
1	STD 1/1	Standard		50.000	0.186	1.000	
2	STD 1/2	Standard		50.000	0.188	1.000	
3	STD 2/1	Standard		100.000	0.330	1.000	
4	STD 2/2	Standard		100.000	0.330	1.000	
5	STD 3/1	Standard		150.000	0.442	1.000	
6	STD 3/2	Standard		150.000	0.445	1.000	
7	STD 4/1	Standard		200.000	0.555	1.000	
8	STD 4/2	Standard		200.000	0.558	1.000	
9	STD 5/1	Standard		250.000	0.682	1.000	
10	STD 5/2	Standard		250.000	0.683	1.000	
11	STD 6/1	Standard		300.000	0.785	1.000	
12	STD 6/2	Standard		300.000	0.784	1.000	
13							

PRECISION DEL SISTEMA FOLIN-CIOCALTEU	
STD 3 - 200,0 mg/mL	ABSORBANCIA
1	0,617
2	0,618
3	0,603
4	0,607
5	0,618
6	0,640
DESVEST	0,013
PROMEDIO	0,617
%RSD	2,084

Anexo F. Precisión Del Metodo Abts

Repetibilidad

Repetibilidad del método ABTS								
mmol Trolox / g cacao en base seca						Media	Desv Std	%RSD
1	2	3	4	5	6			
0,384	0,397	0,372	0,381	0,359	0,337	0,372	0,021	5,68

Reproducibilidad

ANALISTAS	ENSAYOS ABTS (mmol Trolox / g cacao)						ESTADISTICOS	
	1	2	3	4	5	6	x	s
1	0,384	0,397	0,372	0,381	0,359	0,337	0,372	0,021
2	0,371	0,342	0,429	0,392	0,406	0,441	0,397	0,037

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variación	SC	GL	CM	F	F crítico
Entre grupos	0,002	1	0,002	2,11	4,96
Dentro de los grupos	0,009	10	0,001		
Total	0,011	11			

Anexo G. Precisión Del Metodo Dpph

Repetibilidad

Repetibilidad del método DPPH								
mmol Trolox / g cacao en base seca						Media	Desv. Std.	%RSD
1	2	3	4	5	6			
0,328	0,320	0,320	0,322	0,299	0,318	0,318	0,010	3,06

Reproducibilidad

ANALISTAS	ENSAYOS DPPH (mmol Trolox / g cacao)						ESTADISTICOS	
	1	2	3	4	5	6	x	s
1	0,328	0,320	0,320	0,322	0,299	0,318	0,318	0,010
2	0,340	0,273	0,337	0,275	0,300	0,282	0,301	0,030

ANALISIS DE VARIANZA					
Variación	SC	gl	CM	F	F crítico
Entre grupos	0,0008	1	0,00085	1,66	4,96
Dentro de los grupos	0,0051	10	0,00051		
Total	0,0059	11			

Anexo H. Precisión Del Metodo Folin-Ciocalteu

Repetibilidad

Repetibilidad del método Folin -Ciocalteu								
ENSAYOS (mg A. gálico/g cacao)						Media	Desv Std	%RSD
1	2	3	4	5	6			
34,99	34,91	34,43	35,44	35,98	36,32	35,35	0,71	2,01

Reproducibilidad

ANALISTAS	ENSAYOS (mg A. gálico/g cacao)						ESTADISTICOS	
	1	2	3	4	5	6	x	s
1	34,99	34,91	34,43	35,44	35,98	36,32	35,35	0,71
2	34,67	31,07	38,70	38,67	32,08	35,42	35,10	3,20

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variación	SC	GL	CM	F	F crítico
Entre grupos	0,18	1,00	0,18	0,03	4,96
Dentro de los grupos	53,84	10,00	5,38		
Total	54,02	11,00			

Anexo I. Tiempo De Reaccion Para Dpph

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL517,0	Comments
1	DPPH 80 μ M INICIO	Unknown		-1.403	1.004	
2	ESTANDAR 3 0 MIN	Unknown		-1.051	0.925	
3	ESTANDAR 3 10 MIN	Unknown		-0.989	0.911	
4	ESTANDAR 3 20 MIN	Unknown		-0.973	0.907	
5	ESTANDAR 3 30 MIN	Unknown		-0.966	0.905	
6	ESTANDAR 3 40 MIN	Unknown		-0.957	0.903	
7	ESTANDAR 3 50 MIN	Unknown		-0.944	0.900	
8	ESTANDAR 3 60 MIN	Unknown		-0.905	0.892	
9	ESTANDAR 3 70 MIN	Unknown		-0.945	0.901	
10	ESTANDAR 3 80 MIN	Unknown		-0.947	0.901	
11						

Anexo J. Tiempo De Reacción Para Abts

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL734,0	Comments
1	STD 3 INICIAL	Unknown		*****	0.574	
2	STD 3 10 MIN	Unknown		*****	0.555	
3	STD 3 20 MIN	Unknown		*****	0.544	
4	STD 3 30 MIN	Unknown		*****	0.534	
5	STD 3 40 MIN	Unknown		*****	0.524	
6	STD 3 50 MIN	Unknown		*****	0.515	
7	STD 3 60 MIN	Unknown		*****	0.506	
8	STD 3 70 MIN	Unknown		*****	0.498	
9	STD 3 80 MIN	Unknown		*****	0.490	
10	STD 3 90 MIN	Unknown		*****	0.483	
11	STD 3 100 MI	Unknown		*****	0.476	
12	STD 3 110 MI	Unknown		*****	0.469	
13	STD 3 120 MI	Unknown		*****	0.462	
14	STD 3 130 MI	Unknown		*****	0.455	
15	STD 3 140 MI	Unknown		*****	0.449	
16	STD 3 150 MI	Unknown		*****	0.442	
17	STD 3 160 MI	Unknown		*****	0.436	
18						

Anexo K. Tiempo De Reaccion Para Folin-Ciocalteu

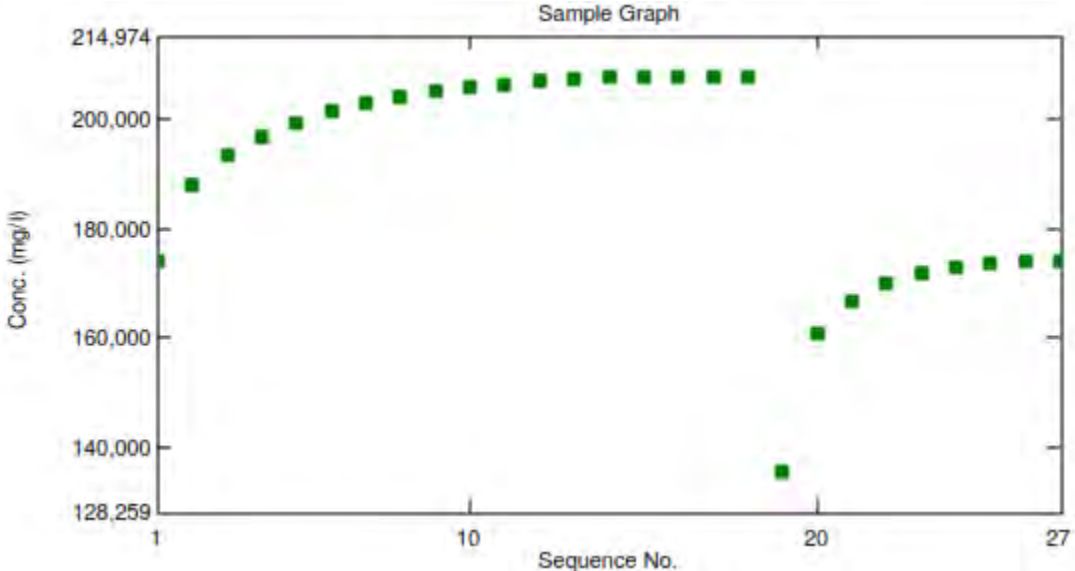
Datos con 1500 µL de carbonato de sodio 7,5%

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL765,0	Comments
1	STD 4 INICIAL	Unknown		173.932	0.542	
2	STD 4 10 MIN	Unknown		187.736	0.583	
3	STD 4 20 MIN	Unknown		193.292	0.600	
4	STD 4 30 MIN	Unknown		196.724	0.610	
5	STD 4 40 MIN	Unknown		199.313	0.617	
6	STD 4 50 MIN	Unknown		201.267	0.623	
7	STD 4 60 MIN	Unknown		202.760	0.628	
8	STD 4 70 MIN	Unknown		204.176	0.632	
9	STD 4 80 MIN	Unknown		205.029	0.634	
10	STD 4 90 MIN	Unknown		205.691	0.636	
11	STD 4 100 MIN	Unknown		206.264	0.638	
12	STD 4 110 MIN	Unknown		206.792	0.639	
13	STD 4 120 MIN	Unknown		207.143	0.641	
14	STD 4 130 MIN	Unknown		207.489	0.642	
15	STD 4 140 MIN	Unknown		207.691	0.642	2
16	STD 4 150 MIN	Unknown		207.748	0.642	3
17	STD 4 160 MIN	Unknown		207.743	0.642	3
18	STD 4 170 MIN	Unknown		207.706	0.642	

Datos con 2000 µL de carbonato de sodio 7,5%

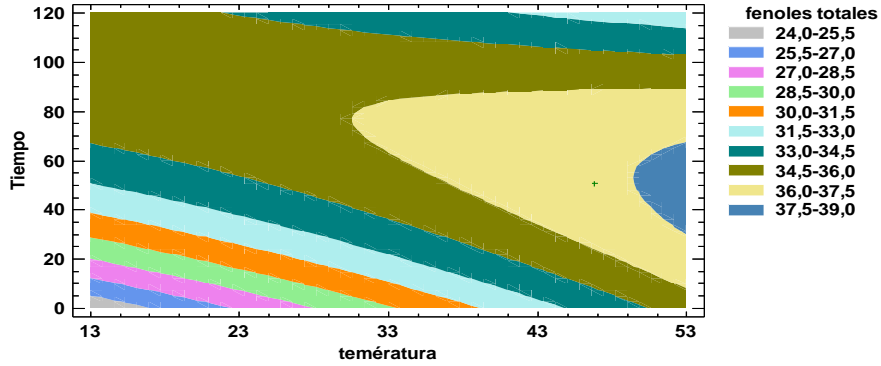
19	STD 4 0 MIN	Unknown		135.485	0.429	2000 uL DE CARBONATO
20	STD 4 10 MINUTOS	Unknown		160.825	0.504	
21	STD 4 20 MINUTOS	Unknown		166.851	0.522	
22	STD 4 30 MINUTOS	Unknown		170.020	0.531	
23	STD 4 40 MINUTOS	Unknown		171.710	0.536	
24	STD 4 50 MINUTOS	Unknown		172.903	0.539	
25	STD 4 60 MINUTOS	Unknown		173.601	0.541	
26	STD 4 70 MINUTOS	Unknown		173.891	0.542	4
27	STD 4 80 MINUTOS	Unknown		173.989	0.543	0,5426

Gráfica de datos con 1500 y 2000 µL de carbonato de sodio 7,5%

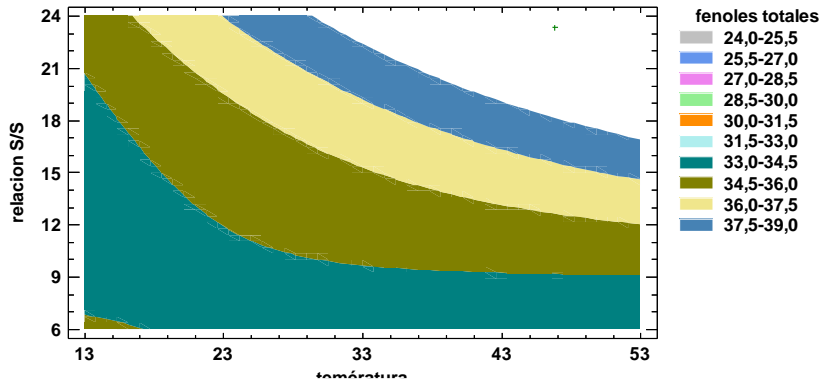


Anexo L. Diagramas De Contorno Superficie De Respuesta

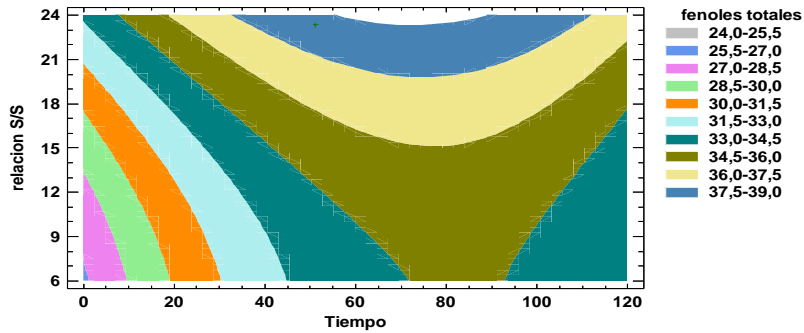
Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada
relacion S/S=15,0



Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada
Tiempo=60,0



Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada
temperatura=30,0



Anexo M. Datos de abts para materiales regionales, anova y prueba de tukey

ABTS (mmol Trolox / g cacao en base seca)					
ENSAYOS	CCL 07	CCL 10	CCL 17	CCL 35	CCL 93
1	0,550	0,423	0,551	0,530	0,392
2	0,498	0,518	0,551	0,583	0,359
3	0,506	0,437	0,549	0,536	0,365
x	0,518	0,459	0,550	0,550	0,372
s	0,028	0,051	0,001	0,029	0,018

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variación	SC	gl	CM	F	F crítico
Entre grupos	0,0686	4	0,0171	18,73	3,48
Dentro de los grupos	0,0092	10	0,0009		
Total	0,0777	14			

PRUEBA DE TUKEY ABTS		
MATERIAL	mmol Trolox/g cacao en base seca	GRUPOS
CCL 17	0,550	A
CCL 35	0,550	A
CCL 07	0,518	B
CCL 10	0,459	C
CCL 93	0,372	D

Anexo N. Datos de dpph para materiales regionales, anova y prueba de tukey

DPPH (mmol Trolox / g cacao en base seca)					
ENSAYOS	CCL 07	CCL 10	CCL 17	CCL 35	CCL 93
1	0,401	0,297	0,453	0,476	0,326
2	0,400	0,370	0,472	0,369	0,313
3	0,402	0,309	0,455	0,385	0,315
x	0,401	0,325	0,460	0,410	0,318
s	0,001	0,039	0,010	0,058	0,007

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variación	SC	gl	CM	F	F crítico
Entre grupos	0,044	4	0,0109	10,86	3,48
Dentro de los grupos	0,010	10	0,0010		
Total	0,054	14			

PRUEBA DE TUKEY DPPH		
MATERIAL	mmol Trolox/g cacao en base seca	GRUPOS
CCL 17	0,460	A
CCL 35	0,410	B
CCL 07	0,401	C
CCL 10	0,325	D
CCL 93	0,318	E


Anexo O. Datos De Fenoles Totales Para Materiales Regionales, Anova Y Prueba De Tukey

FENOLES TOTALES EN mg A. gálico/g cacao en base seca					
ENSAYOS	CCL 07	CCL 10	CCL 17	CCL 35	CCL 93
1	49,10	42,79	55,74	48,62	34,94
2	48,83	44,49	57,69	51,52	34,93
3	52,91	43,98	55,55	50,04	36,16
x	50,28	43,75	56,33	50,06	35,34
s	2,28	0,87	1,19	1,45	0,70

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variación	SC	gl	CM	F	F crítico
Entre grupos	760,23	4	190,06	95,27	3,48
Dentro de los grupos	19,95	10	1,99		
Total	780,18	14			

PRUEBA DE TUKEY FENOLES TOTALES		
MATERIAL	A. gálico mg/g cacao en base seca	GRUPOS
CCL 17	56,33	A
CCL 07	50,28	B
CCL 35	50,06	B
CCL 10	43,75	C
CCL 93	35,34	D

Anexo P. Protocolo Metodo De Folin-Ciocalteu

	CORPORACION PARA LA INVESTIGACION APLICADA AL DESARROLLO	Versión: 1	
	PROTOCOLO METODO DE FOLIN - CIOCALTEU	Página: 2 de 6	Fecha: 07/10/2017

ALCANCE

Determinar el contenido de fenoles totales en muestras de cacao, mediante la determinación de la capacidad que tienen los fenoles para reducir el Mo(VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo adquiere un intenso color azul, que se mide con el espectrofotómetro a una longitud de onda 765 nm y se compara con la absorbancia de una curva de calibración realizada con ácido gálico a unas concentraciones de 50-300 mg/L.

2. INTRODUCCION

El ensayo de Folin-Ciocalteu mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones entre el Mo(VI) y el reductor. El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdo tungstofosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdo tungstofosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (Cicco et al., 2009).

3. SALUD Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Antes de iniciar la práctica se debe utilizar los implementos de seguridad, de acuerdo con lo señalado en el instructivo de seguridad del laboratorio (bata, pantalón, zapatos antideslizantes, gafas de seguridad y guantes de nitrilo).

4. TOMA Y PRESERVACION DE MUESTRAS

Los diferentes materiales se encuentran sembrados y en estado de productivo en parcelas de los cacaocultores del Consejo Comunitario Rescate Las Varas. De cada material vegetal regional seleccionado, se escogerán los mejores árboles en base al estado sanitario a partir de los cuales se obtendrán mazorcas de cacao sanas, se cosecharan una vez presenten las características propias de madurez, de cada tipo de árbol regional, se tomara una muestra de mazorcas suficiente para la realización de los ensayos.

5. EQUIPOS Y MATERIAL DE VIDRIO

5.1 EQUIPOS

Espectrofotómetro UV-Vis, para usarse a una longitud de onda de 734 nm, con una trayectoria de luz de 1 cm.

Micropipetas de 10-100 uL y de 100-1000 uL

Balanza analítica

5.2 MATERIAL DE VIDRIO

Balones aforados ámbar de 5, 10, 25 y 50 mL de capacidad, clase A

Viales ámbar de 10 mL de capacidad

Pipetas aforadas de 1 y 4 mL de capacidad, clase A

6. REACTIVOS

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma- Aldrich) diluido 10 veces con agua destilada.

Reactivo de Carbonato sódico al 10%. Disolver 10g de Na₂CO₃ en 100ml de agua bidestilada.

Solución stock de Ácido gálico: Peso 25 mg de ácido gálico en un balón ámbar de 10 mL y aforar con Acetona:agua:Acido Acético (70:29,5:0,5).

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Curva patrón de Acido galico

7.1.1 Preparación de las soluciones

A partir de la solución madre se preparan diluciones con agua de concentraciones 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ug/mL.

7.1.2 Determinación de la curva de patrón

En ambiente oscuro, transferir una alícuota de 80 µL de cada solución de ácido gálico 10 mL y 1250 µL de reactivo de Folin diluido diez veces y después agitar se adicionan 2000 µL de carbonato de sodio al 7,5%. Los viales se guardan en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente, seguidamente se lee la absorbancia de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, usando como blanco una mezcla de los reactivos y agua en las mismas proporciones mencionadas.

7.2 Preparación de la muestra.

Tomé 50 g de granos de cacao y seque en estufa a 45°C durante 24 horas. A partir de estos granos, tome muestras de 20 g por cada lote, y tritúrelas en un molino (fresh ground coffee), para ser utilizadas en el proceso de extracción por ultrasonido.

7.2.1 Extracción:

Tomé un gramo de muestra seca y molida, y realice una extracción con 25 mL de Acetona:Agua:AcidoAcético (70:29,5:0,5), en un baño de ultrasonido durante 75 minutos a 39 °C, con agitación ocasional, luego filtré a través de un papel filtro Whatman # 4, y tome 1 mililitro de este extracto y llévelo a un balón de 10 mL, afore con agua destilada.

Tomé 80 µL del extracto diluido de la muestra de cacao y deposítelos en un vial ámbar de 10 ml, luego adicionar 1250 µl de reactivo de Folin diluido diez veces y después agitar se adicionan 2000 µl de carbonato de sodio al 7,5%. Los viales se guardan en la oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente, seguidamente se lee la absorbancia de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, usando como blanco una mezcla de los reactivos y agua en las mismas proporciones mencionadas.

8. CALCULOS

A partir del resultado encontrado de la interpolación de la curva de calibración que da el equipo en mg/L de Acido Gálico, se multiplica por la dilución realizada, por 1000 por la cantidad de solvente en litros y se divide entre el peso de la muestra en gramos. De esta manera queda expresado en mgmmol de Trolox por gramo de cacao como se ven en la expresión:

$$\text{mg Acido Gálico/g cacao} = \text{mg/L de Acido Gálico} \times 10/1 \times 0,025 \text{ L/g cacao}$$

9. BIBLIOGRAFIA


Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691-693.

Okezie I. (2002). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research*. Vol 523 (24). 2002. 280 p.

Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Scheirlinck, I., Beheydt, B., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2013). Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3420-3432.

Wollgast, J. (2005). 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 (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Giessen).

Anexo Q. Protocolo Actividad Inhibitoria Del Radicar Abts

 <p>CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIÓN APLICADA AL DESARROLLO CIAD</p>	CORPORACION PARA LA INVESTIGACION APLICADA AL DESARROLLO	Versión: 1	
	PROTOCOLO ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL RADICAL ABTS•+	Página:	Fecha:

ALCANCE

Determinar la capacidad inhibitoria del radical ABTS•+ de muestras de cacao, mediante la estimación de la decoloración que la solución de ABTS•+ experimenta en la reacción, con los antioxidantes presentes en el grano de cacao, y se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón derivado de la vitamina E conocido como Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8 -tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), mediante una curva de calibración a una longitud de onda de 734 nm.

2. INTRODUCCION

Este método se basa en la formación del catión radical 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico), conocido como catión radical ABTS•+. El catión radical se prepara luego de hacer reaccionar ABTS con persulfato potásico (Kuskoski 2004). La ventaja del radical es su estabilidad cuando se encuentra en refrigeración y lejos de la luz. El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrógeno y estabilizar al catión radical ABTS•+. Los resultados se expresan como valores TEAC (μmol de trolox / g de cacao) a partir de la ecuación de regresión lineal de una curva, construida con el estándar Trolox, con concentraciones entre 0,125 y 1,500 mM (Okezie 2002). Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS•+ se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Tovar del Rio 2013).

3. SALUD Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Antes de iniciar la práctica se debe utilizar los implementos de seguridad, de acuerdo con lo señalado en el instructivo de seguridad del laboratorio (bata, pantalón, zapatos antideslizantes, guantes de nitrilo, mascara y gafas de seguridad).

4. MANEJO Y PRESERVACION DE MUESTRAS

Las muestras de grano de cacao procedente de las parcelas de los cacaocultores, previamente seleccionado e identificado con número de lote serán, almacenados en refrigerador a una temperatura de 4°C en bolsas herméticas de polipropileno.

5. EQUIPOS Y MATERIAL DE VIDRIO

5.1.1 EQUIPOS

Espectrofotómetro UV-Vis, para usarse a una longitud de onda de 734 nm, con una trayectoria de luz de 1 cm.

Micro pipetas de 10-100 uL y de 100-1000 uL

Balanza analítica

Vórtex

Ultrasonido

Centrifuga

5.1.2 MATERIAL DE VIDRIO

Balones aforados ámbar de 5, 10, 25 y 50 mL de capacidad, clase A

Viales ámbar de 10 mL de capacidad

Pipetas aforadas de 1 y 4 mL de capacidad, clase A

6. REACTIVOS

ABTS 7 mM: Pese exactamente 38.4 mg de ABTS y disuélvalo en agua destilada en un balón ámbar aforado de 10 ml.

Persulfato de potasio 2.45 mM: Pese exactamente 6.62 mg de persulfato de potasio, y disolverlo en agua destilada en un balón aforado de 10 mL.

Radical catión ABTS•+: Mezcle la solución de ABTS 7 mM con la solución de Persulfato de Potasio 2.45 mM, en un balón ámbar de 25 mL y deje reaccionar por espacio de 16 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Solución de trabajo ABTS•+: a la solución del catión radical ABTS•+ ajústese la absorbancia con metanol hasta 0.70 ± 0.02 unidades a una longitud de onda de 734 nm. (aproximadamente una dilución 1/43).

Solución stock de Trolox 10mM: pese 25,0 mg en un balón ámbar de 10 ml, y disuélvalo con Metanol: agua (70:30) y aforé hasta la marca.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Curva patrón de trolox

7.1.1 Preparación de las soluciones

A partir de la solución stock de TROLOX se hacen las diluciones con Metanol: agua (70:30) que serán los distintos puntos de la recta, con unas concentraciones de acuerdo a la siguiente tabla,

MOLARIDAD STANDAR	DEL	VOLUMEN DE LA SOLUCION STOCK 10 mM TROLOX	VOLUMEN FINAL DE LA DILUCION
0.125 mM		62,5 μ L	5 mL
0,250 mM		125 μ L	5 mL
0,500 mM		250 μ L	5 mL
1,000 mM		500 μ L	5 mL
1,500 mM		750 μ L	5 mL
2,000 mM		1000 μ L	5 mL

7.1.2 Determinación de la curva de patrón

En ambiente oscuro, transferir una alícuota de 40 μ L de cada solución de trolox (0.125 mM, 0.250 mM, 0.500 mM, 1.000 mM, 1.500 mM y 2,000 mM) en viales ámbar de 10 mL, luego adicionar 4mL de la solución de trabajo del radical ABTS (Sección 6.d) y homogeneizar en un Vórtex. Realizar la lectura (734 nm) después de exactamente 30 minutos. Utilizar metanol para el autozero del equipo UV-VIS.

7.2 Preparación de la muestra.

Tomé 50 g de granos de cacao y seque en estufa a 45°C durante 24 horas. A partir de estos granos, tome muestras de 20 g por cada lote, y tritúrelas en un molino (fresh ground coffee), para ser utilizadas en el proceso de extracción por ultrasonido.

7.2.1 Extracción:

Tomé un gramo de muestra seca y molida, y realice una extracción con 25 mL de Acetona:Agua:AcidoAcético (70:29,5:0,5), en un baño de ultrasonido durante 75 minutos a 39 °C, con agitación ocasional, luego filtré a través de un papel filtro Whatman # 4, y tome 1 mililitro de este extracto y llévelo a un balón de 20 mL, afore con metanol-agua 70:30.

Tomé 40 μ L del extracto diluido de la muestra de cacao y deposítelos en un vial ámbar de 10 ml, posteriormente adicione 4 ml de la solución de trabajo ABTS•+ (Sección 6.d) y homogeneizar en un Vórtex. Déjelas en reposo y en ausencia de luz durante 30 min exactos y mida sus absorbancias a 734 nm.

8. CALCULOS

A partir del resultado encontrado de la interpolación de la curva de calibración que da el equipo en mM de Trolox se multiplica por la dilución realizada y por la cantidad de solvente en litros y se divide entre el peso de la muestra en gramos. De esta manera queda expresado en mmol de Trolox por gramo de cacao como se ven en la expresión:

$$\text{mmol Trolox/g cacao} = \text{mM de Trolox} \times 20/1 \times 0,025 \text{ L/g cacao}$$

9. BIBLIOGRAFIA


Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691-693.

Okezie I. (2002). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research*. Vol 523 (24). 2002. 280 p.

Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Scheirlinck, I., Beheydt, B., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2013). Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3420-3432.

Wollgast, J. (2005). 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 (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Giessen).

Anexo R. Protocolo Metodo 1,1-Difenil-2-Picril-Hidrazilo (Dpph)

	CORPORACION PARA LA INVESTIGACION APLICADA AL DESARROLLO	Versión: 1	
	METODO 1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZILO (DPPH)	Página: 2 de 6	Fecha:

1. ALCANCE

Determinar la actividad antioxidante del cacao mediante un cambio de color de violeta a amarillo o naranja tenue producido por la reducción del radical DPPH•, debido a la presencia de antioxidantes en el grano de cacao. La presencia de un antioxidante donante de hidrógeno, genera la forma no radicalaria DPPH-H, la cual reduce la absorbancia de la solución de DPPH• en metanol. La absorbancia se registrará a 517 nm y se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón derivado de la vitamina E conocido como Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8 -tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), mediante una curva de calibración a la misma longitud de onda. Los resultados de este método son expresados como % de actividad antioxidante equivalente a los mg trolox por mg de muestra

2. INTRODUCCION

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Para expresar la actividad atrapadora del radical libre DPPH, se utiliza una curva del antioxidante Trolox a diferentes concentraciones, para equiparar los resultados obtenidos de los extractos con una determinada concentración de dicho antioxidante y expresar de ese modo los resultados como Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox (TEAC).

3. SALUD Y SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Antes de iniciar la práctica se debe utilizar los implementos de seguridad, de acuerdo con lo señalado en el instructivo de seguridad del laboratorio (bata, pantalón, zapatos antideslizantes, guantes de nitrilo, mascara y gafas de seguridad).

4. MANEJO Y PRESERVACION DE MUESTRAS

Las muestras de grano de cacao procedente de las parcelas de los cacaocultores, previamente seleccionado e identificado con número de lote (N° X) serán, almacenados en refrigerador a una temperatura de 4°C en bolsas herméticas de polipropileno.

5. EQUIPOS Y MATERIAL DE VIDRIO

5.1.1 EQUIPOS

Espectrofotómetro UV-Vis, para usarse a una longitud de onda de 517 nm, con una trayectoria de luz de 1 cm.

Micro pipetas de 10-100 uL y de 100-1000 uL

Balanza analítica

Vórtex

Ultrasonido

Centrífuga

5.1.2 MATERIAL DE VIDRIO

Balones aforados ámbar de 5, 10, 25 y 50 mL de capacidad, clase A

Viales ámbar de 10 mL de capacidad

Pipetas aforadas de 1 y 4 mL de capacidad, clase A

6. REACTIVOS

Solución stock de DPPH 1,0 mM: Pese exactamente 9,86 mg de DPPH en un balón aforado ámbar de 25 mL y afore con metanol.

DPPH 80 µM: Diluya 4 mL de la solución stock de DPPH 1,0 mM en un balón aforado ámbar de 50 mL.

Solución stock de Trolox 10mM: pese 25,8 mg (97,8% de pureza) en un balón ámbar de 10 ml, y disuélvalo con Metanol: agua (70:30) y aforé hasta la marca.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Curva patrón de trolox

7.1.1 Preparación de las soluciones

A partir de la solución stock de TROLOX se hacen las diluciones que serán los distintos puntos de la recta, con unas concentraciones de acuerdo a la siguiente tabla,

MOLARIDAD STANDAR	DEL	VOLUMEN DE LA SOLUCION STOCK 10 mM TROLOX	VOLUMEN FINAL DE LA DILUCION
0.125 mM		62,5 μ L	5 mL
0,250 mM		125 μ L	5 mL
0,500 mM		250 μ L	5 mL
1,000 mM		500 μ L	5 mL
1,500 mM		750 μ L	5 mL
2,000 mM		1000 μ L	5 mL

7.1.2 Determinación de la curva de patrón

En ambiente oscuro, transferir una alícuota de 40 μ L de cada solución de trolox (0.125 mM, 0.250 mM, 0.500 mM, 1.000 mM, 1.500 mM y 2.000 mM) en viales ámbar de 10 mL, luego adicionar 4mL de la solución de trabajo del radical DPPH 80 μ M (sección 6.b) y homogeneizar en un Vórtex. Realizar la lectura (517 nm) después de exactamente 30 minutos. Utilizar metanol para el autozero del equipo UV-VIS.

7.2 Preparación de la muestra.

Tomé 50 g de granos de cacao y seque en estufa a 45°C durante 24 horas. A partir de estos granos, tome muestras de 20 g por cada lote, y tritúrelas en un molino (fresh ground coffee), para ser utilizadas en el proceso de extracción por ultrasonido.

7.2.1 Extracción:

Tomé un gramo de muestra seca y molida, y realice una extracción con 25 mL de Acetona:Agua:AcidoAcético (70:29,5:0,5), en un baño de ultrasonido durante 75 minutos a 39 °C, con agitación ocasional, luego filtré a través de un papel filtro Whatman # 4, y tome 1 mililitro de este extracto y llévelo a un balón de 20 mL, afore con metanol-agua 70:30.

Tomé 40 μ L del extracto diluido de la muestra de cacao y deposítelos en un vial ámbar de 10 ml, luego adicionar 4mL de la solución de trabajo del radical DPPH 80 μ M (sección 6.b) y homogeneizar en un Vórtex. Realizar la lectura (517 nm) después de exactamente 30 minutos. Utilizar metanol para el autozero del equipo UV-VIS.

8. CALCULOS

A partir del resultado encontrado de la interpolación de la curva de calibración que da el equipo en mM de Trolox se multiplica por la dilución realizada y por la cantidad de solvente en litros y se divide entre el peso de la muestra en gramos. De esta manera queda expresado en mmol de Trolox por gramo de cacao como se ven en la expresión:

$$\text{mmol Trolox/g cacao} = \text{mM de Trolox} \times 20/1 \times 0,025 \text{ L/g cacao}$$

9. BIBLIOGRAFIA

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691-693.

Okezie I. (2002). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research*. Vol 523 (24). 2002. 280 p.

Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Scheirlinck, I., Beheydt, B., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2013). Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3420-3432.

Wollgast, J. (2005). 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 (Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Giessen).