



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

EFFECTO DEL PROCESADO EN EL CONTENIDO Y PERFIL DE POLIFENOLES DE CACAO

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO: Diego Portillo Liso

TUTOR ACADÉMICO: José Manuel Barat Baviera
Édgar Pérez Esteve
TUTORA EXPERIMENTAL: María Jesús Lerma García

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2017

EFFECTO DEL PROCESADO EN EL CONTENIDO Y PERFIL DE POLIFENOLES DE CACAO

Diego Portillo Liso¹, Édgar Pérez Esteve¹, María Jesús Lerma García¹, José Manuel Barat Baviera¹

RESUMEN

El cacao en polvo es el producto obtenido de la molienda de la torta de cacao tras el prensado y eliminación de la grasa. Durante el proceso de transformación de la semilla de cacao en cacao en polvo se dan lugar una serie de procesos primarios (fermentación, tostado...) y secundarios (molturación, desgrasado, alcalinización...) que tienen por objetivo desarrollar aromas y color, así como mejorar la conservación y solubilidad del producto. El presente trabajo tiene por objetivo determinar el impacto de cada una de estas operaciones sobre la capacidad antioxidante, el contenido en polifenoles totales, y la concentración de antocianinas, proantocianidinas y flavanoles. Para ello se han recopilado muestras (n=27) que abarcan desde la semilla de cacao no fermentada hasta cacaos en polvo con diferentes grados de alcalinización. El conjunto de muestras se han analizado mediante cromatografía líquida y técnicas espectrocolorimétricas. Los resultados obtenidos demuestran que la fermentación es la etapa donde se pierden la mayor parte de polifenoles. Este hecho conlleva una pérdida del 30% de los polifenoles totales, la cual aumenta hasta el 80-90% tras las operaciones de tostado y alcalinización fuerte.

Palabras clave: cacao, procesado, polifenoles, antocianinas, proantocianidinas, flavanoles.

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n,46022, Valencia, España.

ABSTRACT

Cocoa powder is the product obtained from the grinding of the cocoa cake after the pressing and removal of the fat. A series of primary processes (fermentation, roasting ...) and secondary processes (grinding, degreasing, alkalization ...) are carried out during the process of transforming the cocoa seed into cocoa powder, which aim to develop aromas and color as well as to improve the preservation and solubility of the product. The objective of this work is to determine the impact of each one of these operations on the antioxidant capacity, the total polyphenol content, and the concentration of anthocyanins, proanthocyanidins and flavanols. For this purpose, samples (n=27) have been collected, ranging from unfermented cocoa seed to cocoa powder with different degrees of alkalization. The samples were analyzed by liquid chromatography and spectrophotometric techniques. The results show that fermentation is the stage where the majority of polyphenols are lost. This fact leads to a loss of 30% of the total polyphenols, a loss that increases up to 80-90% after toasting and strong alkalization.

Keywords: cocoa, processed, polyphenols, anthocyanins, proanthocyanidins, flavanols.

RESUM

El cacau en pols és el producte obtingut després de moldre la coca de cacau. Durant el procés de transformació de la llavor de cacau en cacau en pols es donen lloc una sèrie de processos primaris (fermentació, torrat ...) i secundaris (molturació, desgreixat, alcalinització ...) que tenen per objectiu desenvolupar aromes i color, així com millorar la conservació i solubilitat del producte. El present treball té per objectiu determinar l'impacte de cadascuna d'aquestes operacions sobre la capacitat antioxidant, el contingut en polifenols totals, i la concentració de antocianines, proantocianidines i flavanols. Per a això s'han recopilat mostres (n=27) que inclouen des de la llavor de cacau no fermentada fins cacaos en pols amb diferents graus d'alcalinització. El conjunt de mostres s'han analitzat mitjançant cromatografia líquida i tècniques espectrofotomètriques. Els resultats obtinguts demostren que la fermentació és l'etapa on es perden la major part de polifenols. Aquest fet comporta una pèrdua del 30% dels polifenols totals, la qual augmenta fins al 80-90% després de les operacions de torrat i alcalinització forta.

Paraules clau: cacau, processat, polifenols, antocianines, proantocianidines, flavanols.

1. INTRODUCCIÓN

El cacao en polvo, producto obtenido de la semilla del cacao (*Theobroma cacao*) es una materia prima de gran importancia en la industria alimentaria. Este producto se considera una materia prima esencial en la fabricación de galletas, tortas y productos de panadería, helados y bebidas de chocolate debido a su capacidad para dar sabor y color.

El cacao se cultiva en África, América Central y Sudamérica, siendo Costa de Marfil el principal productor con un 25% de la producción mundial (Bordiga *et al.*, 2015).

El proceso de producción del cacao en polvo (Figura 1) es complejo. Éste se inicia con la recolección de la vaina o mazorca de cacao y la extracción de las 30-40 semillas que contiene. Las **semillas** son fermentadas con el objetivo de desarrollar los precursores del aroma a cacao, y reducir la acidez y la astringencia (Nazaruddin *et al.*, 2006).

Posteriormente, las semillas fermentadas son sometidas a un secado cuyo objetivo es reducir su contenido en humedad, para lo que se emplean temperaturas comprendidas entre 120 y 150°C dependiendo del producto (Wollgast y Anklam, 2000).

Tras el secado, las semillas se descascarillan mediante un proceso físico que da como lugar a las **virutas de cacao o nibs**. Éstas se someten a un proceso de tostado a altas temperaturas (120-150°C) que contribuye además de a la reducción de la carga microbiana a la formación de aromas, sabores y colores típicos de los productos de cacao (Bustamante *et al.*, 2015).

El proceso continúa con la molturación y refinado de las virutas de cacao dando lugar a una mezcla de componentes magros y grasos en forma líquida conocida como **licor de cacao**, que tras un proceso de prensado da lugar a dos productos: **la manteca** de cacao que se utiliza como grasa vegetal y la **torta** de cacao que se utiliza para la elaboración de productos de cacao. La torta de cacao es posteriormente molida hasta un tamaño de partícula muy fino, que da lugar al **cacao natural en polvo**.

Previamente a la molturación, la torta también puede ser sometida a un tratamiento con álcalis (NaOH, K₂CO₃...) a alta temperatura conocido como alcalinización con el objetivo de mejorar sus cualidades tecnológicas y sensoriales (Hii *et al.*, 2009). Durante la alcalinización del cacao, se neutraliza el pH reduciendo su acidez, astringencia y se desarrollan aromas y sabores. Además, se desarrollan coloraciones oscuras a causa de la reacción de los pigmentos del cacao y el álcali.



Figura 1. Esquema del proceso de producción del cacao en polvo.

Entre las características del cacao destacan, además de sus propiedades sensoriales que lo hacen óptimo para la preparación de una multitud de productos, un número de componentes funcionales conocidos como polifenoles que se encuentran asociados a beneficios para la salud (Wollgast y Anklam, 2000). Entre ellos destacan la capacidad de inhibir la peroxidación de los lípidos (Keen, 2001) y evitar la presencia de radicales libres, los cuales dañan el organismo a nivel celular. Este daño producido por los radicales libres puede aumentar el riesgo del desarrollo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Padilla *et al.*, 2008). Por otra parte, investigaciones recientes relacionan el consumo de polifenoles del cacao con la disminución de la presión arterial (Visioli *et al.*, 2009), efectos analgésicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, inmunitarios, antimicrobiales y vasodilatadores (Jonfia-Essien *et al.*, 2008) y actividad antimutagénica (Natsume *et al.*, 2000).

El contenido en polifenoles del cacao varía dependiendo de la variedad, condiciones de crecimiento, fermentación, temperatura, etc. (Redovnikovic *et al.*, 2009). En general, en la semilla de cacao sin fermentar, los polifenoles pueden suponer del 12 al 18% de su peso. De todos los polifenoles encontrados en el cacao, los flavonoides son los componentes mayoritarios. Entre ellos destacan las proantocianidinas oligoméricas (58%), los flavanoles (37%) y las antocianinas (4%) (Andrés-LaCueva *et al.*, 2008; Bordiga *et al.*, 2015). Concretamente, las antocianinas más importantes halladas en la semilla de cacao son el cianidin-3-arabinósido y cianidin-3-galactósido (Wollgast y Anklam, 2000). Por su parte, los flavanoles más importantes son la catequina y epicatequina.

Sin embargo, estudios recientes indican que el contenido en polifenoles puede disminuir durante los procesos de fermentación y secado debido a reacciones de polimerización y a la acción de la enzima polifenol oxidasa que provocan la formación de los característicos pigmentos pardos (Hii *et al.*, 2009). Las antocianinas se hidrolizan en antocianidinas que son polimerizadas en catequinas para formar taninos complejos durante la fermentación (Hii *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado en varios estudios que la alcalinización afecta al contenido de polifenoles, y a su vez, a su capacidad antioxidante (Stanley *et al.*, 2015).

Pese a la diversidad de estudios que tienen por objetivo el desarrollo de métodos cromatográficos para el análisis de flavonoides en cacao o la caracterización del perfil polifenólico en muestras de cacao, no existe ningún trabajo que estudie de manera integral todos los cambios en la cantidad y tipología de polifenoles del cacao a lo largo del procesado primario y secundario.

En este contexto, el presente trabajo tiene por objetivo determinar la capacidad antioxidante, el contenido en polifenoles totales y la concentración de antocianinas, proantocianidinas y flavanoles de una colección de muestras de cacao que incluye semillas de cacao no fermentado, semillas de cacao fermentado, virutas, licor, cacaos naturales y cacaos con distintos grados de alcalinización.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima y reactivos

Las muestras de cacao empleadas en este estudio (un total de 27 muestras) han sido proporcionadas por una empresa valenciana. Entre ellas se incluyen muestras de semilla no fermentada (**SNF**), semilla fermentada (**SF**), virutas de cacao (**N**), licor (**L**) y polvos de cacao con diferente grado de alcalinización: natural (**NA**), alcalino suave (**AS**), alcalino medio (**AM**), alcalino fuerte (**AF**) y negro (**B**). Tras su llegada al laboratorio, las muestras fueron liofilizadas, desgrasadas mediante extracción con hexano y almacenadas en condiciones de baja humedad y oscuridad hasta su análisis.

Los reactivos y disolventes empleados en este estudio fueron: metanol, ácido clorhídrico, acetona, carbonato de sodio, reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu, ácido gálico, N,N-dimetilformamida, diclorometano (Sharlau, Barcelona, España), cianidin 3-O- α -arabinopiranosido, cianidin 3-O- β -galactopiranosido (Polyphenols AS, Noruega), catequina, epicatequina, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), ácido acético, acetonitrilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y trolox (Acros Organics, New Jersey, EUA).

2.2. Caracterización del grado de alcalinización de los cacaos en polvo

Las muestras de cacao fueron caracterizadas de acuerdo con su pH extractable y color con el objetivo de clasificarlas en 5 categorías. Según el valor de pH, las muestras se dividen en 4 grupos (Miller *et al.*, 2008): cacaos **naturales (NA)** (pH 5-6), alcalinos suaves (**AS**) (pH 6-7,2), alcalinos medios (**AM**) (pH 7,21-7,6) y alcalinos **fuertes (AF)** (pH > 7,6). Además, mediante la medida del color, fue posible distinguir entre cacaos alcalinos fuertes y cacaos **negros (B)**.

Para medir el pH extractable se siguió el método descrito en el manual del cacao y del chocolate (ADM Cocoa, 2013) con algunas modificaciones. Para ello se preparó una solución de 2,5 g de cacao en polvo en 12,5 mL de agua destilada a 80 °C y se agitó. Una vez dispersado el polvo se añadieron otros 12,5 mL de agua a temperatura ambiente y se dejó enfriar la suspensión hasta temperatura ambiente. La toma de datos se realizó por triplicado utilizando un pH metro Crisonbasic 20+ (Barcelona, España).

Para realizar las medidas del color intrínseco se preparó una suspensión de 3,75 g de cacao en polvo en 25 mL de agua destilada a 80°C, se mezcló y luego se añadieron otros 25 mL de agua destilada para enfriar la solución siguiendo el método descrito en el manual del cacao y del chocolate (ADM Cocoa, 2013) con algunas modificaciones. Una vez templada la muestra se registraron las coordenadas de color CIE L*, a* y b* (observador 10° e iluminante D65) en un espectrocolorímetro Minolta CM 3600D (Tokio, Japón).

2.3. Determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante

La determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante se realizó a partir de un extracto fenólico hidroalcohólico obtenido según el método descrito por Martín *et al.* (2008). Para ello se pesó 1 g de muestra y se añadieron 40 mL de una disolución de metanol y ácido clorhídrico 16 mM (50:50, v/v). A continuación, las muestras se mantuvieron 1 h en agitación constante en un agitador orbital y se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizó una segunda extracción con 40 mL de una disolución de acetona y agua (70:30, v/v), manteniéndose de nuevo 1 h en agitación constante en un agitador orbital, y centrifugándose a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes de ambas extracciones se combinaron y se llevaron a volumen final de 100 mL con agua destilada.

El contenido de polifenoles totales en el extracto polifenólico se determinó espectrofotométricamente según el método de Folin-Ciocalteu, tomándose en un tubo de ensayo 50 µL de muestra, 450 µL de una solución de metanol/agua (1:1), 4 mL de carbonato cálcico (Na₂CO₃) y 5 mL de una solución de Folin-Ciocalteu diluido 1:10. Tras ello se dejó en oscuridad durante una hora y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra seca y desgrasada (msd). La curva de calibración se preparó en el intervalo de concentraciones de 50-1000 mg L⁻¹ de ácido gálico. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

La capacidad antioxidante de los extractos fenólicos de las muestras de cacao se determinó por el método basado en la estabilidad del radical DPPH, que consiste en añadir 6 µL de muestra con 294 µL de metanol y 2,7 mL de una disolución metanólica de DPPH (25 mg L⁻¹). La mezcla se incubó en oscuridad durante una hora y midió la absorbancia de las muestras a 517 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalente de trolox por 100 g msd. La curva de calibración se preparó en el intervalo de concentraciones de 5-50 mg L⁻¹ de trolox. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

2.4. Preparación de muestra para la determinación de antocianinas, proantocianidinas y flavanoles

La preparación de las muestras de cacao para su posterior análisis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Hellstrom y Mattila (2008) con algunas modificaciones. Para ello, se pesó 1 g de cacao y se suspendió en 20 mL de una disolución de acetona/metanol/agua (2:2:1, v/v/v), metiéndose en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 4 minutos a 10°C y se recogió el sobrenadante obtenido. Este proceso se repitió tres veces, mezclando los 3 sobrenadantes y llevando hasta sequedad en un rotavapor a 40°C. El residuo obtenido se redisolvió con 1 mL metanol. Esta solución se purificó mediante el empleo de cartuchos de extracción en fase sólida, haciendo pasar todo el volumen (1 mL) por un cartucho Discovery DPA-6S de poliamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), previamente acondicionado con metanol y agua. Los azúcares así como otros compuestos interferentes se eliminaron lavando los cartuchos con

5 mL de una disolución acuosa conteniendo 20% de metanol. A continuación, los analitos de interés se eluyen empleando 5 mL de una disolución de N, N-dimetilformamida.

2.5. Determinación del contenido de antocianinas, proantocianidinas y flavanoles mediante HPLC

El contenido en antocianinas y proantocianidinas se determinó mediante HPLC en fase normal (NP-HPLC), mientras que el contenido en flavanoles (catequina y epicatequina) se estableció mediante HPLC con fase reversa (RP-HPLC). En ambos casos se empleó un cromatógrafo de líquidos Hitachi LaChrom Elite (Hitachi Ltd., Tokio, Japón), dotado de una bomba cuaternaria modelo L-2130, un compartimento termostatzado de columnas modelo L-2300, y un detector UV-vis (modelo L-2420).

Las condiciones cromatográficas para la determinación de antocianinas y proantocianidinas se adaptaron de Hammerstone *et al.* (1999). La separación se llevó a cabo en una columna Luna de sílica de 5 μm (250 x 4,6 mm) de Phenomenex (Torrance, CA, EUA). Como fase móvil se empleó una mezcla terciaria de diclorometano (A), metanol (B) y agua-ácido acético (1:1, v/v, C). La elución se llevó a cabo con un caudal de 1 mL min⁻¹ mediante el siguiente gradiente, manteniendo constante un 4% de C: 0-30 min, 14-28,4% B; 30-60 min, 28,4-50% B; 60-65 min, 50-86% de B, y por último un isocrático de 5 min más del 86% de B. La detección se llevó a cabo a 280 nm (proantocianidinas) y a 520 nm (antocianinas); volumen de inyección, 20 μL .

Las condiciones de separación de los flavanoles se adaptaron de Elwers *et al.* (2009). La separación se llevó a cabo a 40 °C con una columna Liquid Purple C18 de 5 μm (250 x 4,6 mm) de Análisis Vínicos (Tomelloso, España). Como fase móvil se empleó una mezcla de agua conteniendo 2% de ácido acético (A) y acetonitrilo/agua/ácido acético (400:90:10, v/v/v) (B). La elución se llevó a cabo con un caudal de 1,2 mL min⁻¹ mediante el siguiente gradiente: 0-8 min, 10% B; 8-20 min, 10-15% B; 20-35 min, 10-90% B; 35-50 min, 90% B. La detección se llevó a cabo a 280 nm; volumen de inyección, 20 μL . Cada una de las muestras se analizó por duplicado.

Para la cuantificación de los diferentes analitos se emplearon 2 patrones de antocianinas (cianidin 3-O- α -arabinopiranosido, cianidin 3-O- β -galactopiranosido) y 2 patrones de flavanoles (catequina y epicatequina). Para cada uno de estos analitos, se construyó una recta de calibrado mediante la inyección de seis disoluciones estándar de cada uno de los patrones, obteniéndose para todos los patrones líneas rectas con $r^2 > 0,9996$. Para la cuantificación de los oligómeros y polímeros de proantocianidinas, se empleó la recta de calibrado de la catequina (Ortega *et al.*, 2008a), dado que no existen patrones comerciales de estos compuestos.

2.6. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.17 (StatPoint Technologies, Inc., 2011). Con el objetivo de comprobar el efecto del procesado sobre cada uno de los parámetros evaluados, se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). El procedimiento LSD (least significant difference) se utilizó para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las muestras

Tras su llegada al laboratorio las muestras de cacao en polvo fueron caracterizadas de acuerdo a su pH extractable y color intrínseco para poder clasificar las muestras en 5 categorías (ver sección 2.2). Atendiendo a estos criterios, 5 muestras fueron catalogadas como naturales, 4 como alcalinas suaves, 3 como alcalino medio, 8 como alcalino fuerte y 3 como cacao negro.

3.2. Determinación del contenido en polifenoles totales

En la **Figura 2a** se muestra el contenido en polifenoles determinado por el método Folin-Ciocalteu en el conjunto de muestras utilizadas. Como puede observarse, la muestra correspondiente a las semillas no fermentadas mostró el contenido polifenólico máximo (9,95 g AG/100 g msd). Este valor está en consonancia con los valores reportados por otros autores (Ozguven *et al.*, 2016), teniendo en cuenta que el contenido en polifenoles está muy influenciado por el origen, la variedad, condiciones de procesado o condiciones ambientales (Redovnikovic *et al.*, 2009).

El contenido en polifenoles totales en la muestra de semilla fermentada fue un 30% menor que en la semilla no fermentada (6,31 g AG/100 g de cacao seco y desgrasado). Esta disminución del contenido en polifenoles ha sido reportada por otros autores (Fontes *et al.*, 2015; Payne *et al.*, 2010) y está asociada entre otros factores a la difusión de los polifenoles fuera de los cotiledones del grano del cacao durante la fermentación.

El contenido en polifenoles siguió disminuyendo en las etapas de procesado posteriores. En concreto, el contenido en las virutas de cacao fue de 5,20 g AG/100 g de virutas secas y desgrasadas y de 4,23 g AG/100g en el licor seco y desgrasado. Esta pérdida ha sido asociada por otros autores al descascarillado (Wollgast y Anklam, 2000; Bustamante *et al.*, 2015) y al tratamiento de tostado previo a la trituration y refinado (Wollgast y Anklam, 2000, Redovnikovic *et al.*, 2015).

Entre los cacaos naturales, el contenido en polifenoles totales osciló entre 4,45 (NA1) y 3,88 (NA2) g AG/100 g msd. Estos valores son similares a los obtenidos en otros estudios (Padilla *et al.*, 2008; Todorovic *et al.*, 2015).

Comparando el contenido entre las muestra naturales y alcalinas, se puede observar cómo el grado de alcalinización reduce el contenido en

polifenoles totales. De esta manera, en cacaos fuertemente alcalinizados el contenido en polifenoles totales (2,01-1,08 g AG/100g msd) puede suponer un descenso del 80-90% en comparación con el contenido en la semilla de cacao no fermentada o del 50-75% con respecto al contenido en el cacao en polvo natural (3,54-4,45g AG/100g msd). Este fuerte descenso también ha sido observado en otros estudios llevados a cabo por Nazaruddin *et al.* (2006), Andrés-Lacueva *et al.* (2008), Stalh *et al.* 2009, Payne *et al.* (2010) y Todorovic *et al.* (2015). Concretamente, Todorovic *et al.* (2015) encontraron 3,43-4,15 g AG/100 g en cacaos naturales, 2,49 g AG/100 g en cacaos alcalinos suaves y 1,07 g AG/100 g en cacaos alcalinos fuertes. En estos estudios se asocia la pérdida de polifenoles totales a la reducción del contenido de catequina y epicatequina.

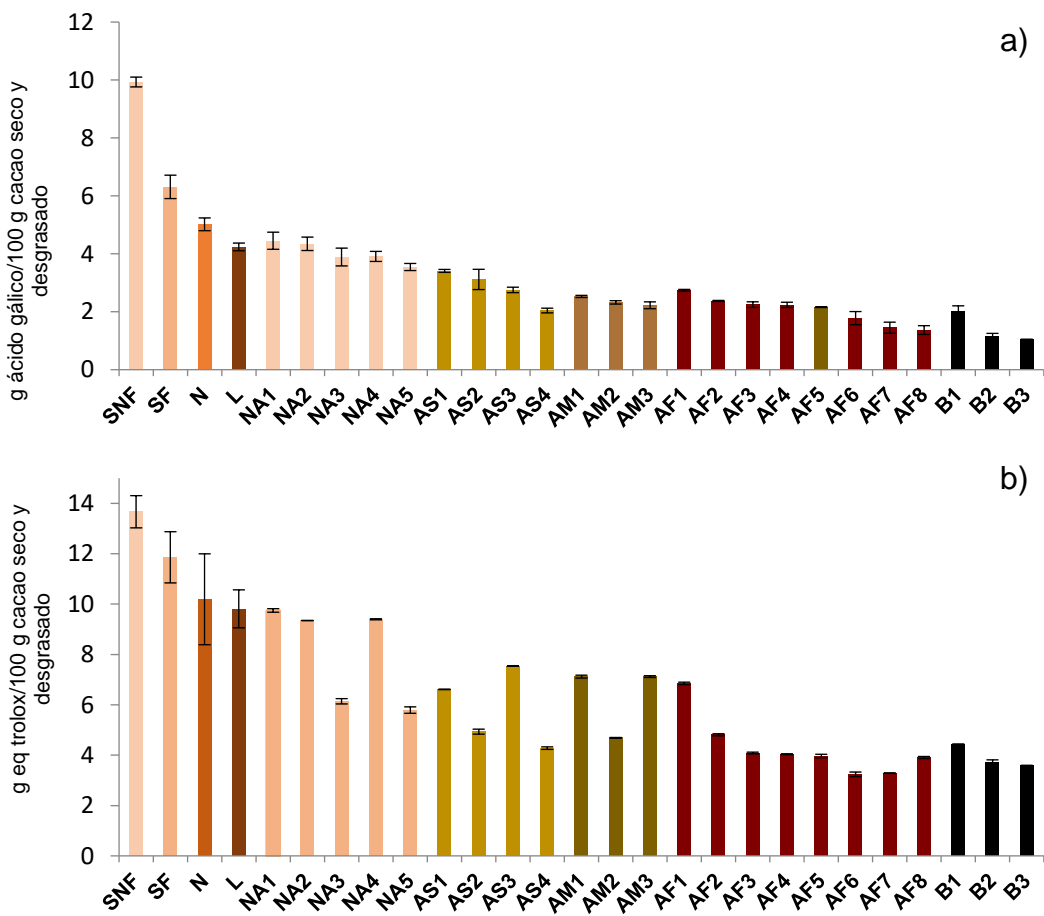


Figura 2. Valores (media \pm DE) del contenido en polifenoles totales de las muestras de cacao **(a)** y capacidad antioxidante determinada por el método DPPH en los diferentes tipos de cacao **(b)**. SNF: semilla no fermentada, SF: semilla fermentada, N: virutas de cacao, L: licor, NA: cacao natural, AS: cacao alcalino suave, AM: cacao alcalino medio, AF: cacao alcalino fuerte, B: negro.

3.3. Determinación de la capacidad antioxidante

La **Figura 2b** muestra los valores de capacidad antioxidante obtenidos para el conjunto de muestras analizadas. En consonancia con los resultados del contenido en polifenoles totales, la semilla de cacao no fermentada fue la muestra con el mayor poder antioxidante. En concreto, esta muestra mostró una capacidad antioxidante de 14,0 g Eq trolox/100g msd. Este valor disminuyó progresivamente para la semilla fermentada (11,5 g Eq trolox/100g msd, virutas (10,2 g Eq trolox/100g msd) y licor (9,8 g Eq a trolox/100g msd). Como puede observarse, no se observa una gran diferencia en la capacidad antioxidante entre las muestras de semilla fermentada, virutas y licor. Este mismo comportamiento fue previamente descrito por Ortega *et al.* (2008b).

En la **Figura 2b** también se puede apreciar cómo la capacidad antioxidante de las muestras disminuye al incrementarse el grado de alcalinización de los cacaos en polvo. De esta manera, la capacidad antioxidante de las muestras de cacao natural (5,7-9,7 g Eq trolox/100g msd) se vio reducida en más del 25% en las muestras de cacao alcalino medio (4,7-7,1 g Eq trolox/100g msd) y en más del 60% en las muestras de cacao negro (3,5-4,4 g Eq trolox/100g msd). Este descenso en la capacidad antioxidante está estrechamente relacionado con el descenso en el contenido de polifenoles totales. Por ello, al realizar análisis de correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante se encontró un $r^2=0,8106$. Esta correlación existente entre ambos parámetros (polifenoles totales y capacidad antioxidante) ha sido previamente descrita por Nazario *et al.*, 2014, quienes indican que valores altos de ambos parámetros se deben a la capacidad que poseen los polifenoles de ceder electrones para generar una respuesta antioxidante.

3.4. Optimización de las condiciones de extracción, preconcentración y purificación de antocianinas, proantocianidinas y flavanoles

Con el fin de obtener las mejores condiciones de extracción de los diferentes compuestos fenólicos considerados en este estudio, se compararon diferentes procedimientos previamente propuestos en bibliografía. El primero de los protocolos se adaptó de Hammerstone *et al.* (1999). Se pesó 1 g de muestra en un tubo Falcon, y se adicionaron 20 mL de acetona/agua (70:30, v/v). La mezcla se dejó en agitación durante 15 minutos a 20°C y 600 rpm para posteriormente llevarla a centrifugación durante 10 minutos a 10°C y 10000 rpm. Tras ello, se guardó el sobrenadante obtenido y este proceso se repitió 2 veces más empleando en este caso 20 mL de metanol/agua (70:30, v/v). Los 3 sobrenadantes combinados se llevaron a sequedad en un rotavapor a 40°C, y el residuo resultante se redisolvió en 1 mL de metanol.

Por otro lado, también se testeó el método descrito por Hellstrom y Mattila (2008) previamente descrito en la sección 2.4. El extracto fenólico obtenido por ambos métodos fue directamente inyectado en el HPLC. Adicionalmente, ambos extractos fueron también purificados empleando extracción en fase sólida (SPE) con 2 tipos de cartucho diferentes: cartuchos SPE Solid Purple C18 500 mg/6 mL (Análisis Vínicos, Tomelloso, España) y con cartuchos Discovery DPA-6S de poliamida (Sigma-Aldrich). Los cartuchos SPE Solid Purple C18 fueron previamente activados con metanol y agua desionizada. A continuación, tras cargar la muestra, se pasaron 10 mL de agua desionizada con el fin de eliminar interferentes, y se eluyeron los analitos de interés con 5 mL de una mezcla de acetona/agua/ácido acético (70/29,5/0,5, v/v/v). Por otro lado, la purificación con los cartuchos Discovery DPA-6S de poliamida se realizó tal y como viene indicado en la sección 2.4.

Una vez obtenidas todas las muestras (6 en total, 2 muestras previas a la purificación con SPE, y 4 tras SPE), éstas fueron inyectadas en el HPLC. Las muestras obtenidas con ambos métodos previas al SPE dieron lugar a cromatogramas con múltiples picos que desaparecían tras la extracción en fase sólida, confirmando la eficiencia de la SPE en la eliminación de interferentes.

Todas las muestras obtenidas tras SPE dieron lugar a perfiles similares, si bien la muestra obtenida con el protocolo adaptado de Hellstrom y Mattila (2008) empleando la purificación con el cartucho Discovery DPA-6S de poliamida dio lugar a picos más sensibles y más eficaces. Por ello, se seleccionó este protocolo para la cuantificación de todos los analitos en todas las muestras.

3.5. Determinación del contenido de antocianinas, proantocianidinas y flavanoles mediante HPLC

Una vez establecido el contenido de polifenoles totales, así como la capacidad antioxidante de las muestras, se procedió a la determinación del contenido de antocianinas, proantocianidinas y flavanoles (catequina y epicatequina) mediante HPLC.

3.5.1. Determinación del contenido de antocianinas y proantocianidinas

En primer lugar se procedió a la cuantificación del contenido de antocianinas y proantocianidinas mediante HPLC en fase normal, determinándose las mismas a 520 y 280 nm, respectivamente.

En la **Figura 3** se muestra un cromatograma correspondiente a una muestra de semilla de cacao no fermentada a 520 nm, donde se identificaron mediante inyección de patrones los picos correspondientes a las 2 antocianinas mayoritarias del cacao: el cianidin3- α -L-arabinósido y el cianidin-3- β -D-glucósido.

El contenido de antocianinas encontrado en las muestras de cacao se incluye en la **Figura 4**. Tal y como se observa en esta figura, el mayor contenido encontrado (266 mg/100g msd de cianidin3- α -L-arabinósido y 86,2 mg/100g msd de cianidin-3- β -D-glucósido) se obtuvo en la semilla de cacao

no fermentada. Este contenido disminuyó casi un 90% en la semilla fermentada. El contenido de antocianinas fue todavía significativamente inferior ($p < 0.05$) en las virutas y el licor, si bien el descenso fue menos notable. No fue posible detectar la presencia de antocianinas (pigmentos de color morado) en ninguno de los cacaos en polvo analizados en este estudio. Esta disminución pudo ser debida a la condensación de antocianinas en taninos insolubles durante la fermentación o la destrucción de los compuestos por acción del calor durante el tostado de las virutas de cacao, procesos que dan lugar al característico color marrón del cacao en polvo (Wollgast y Anklam, 2000).

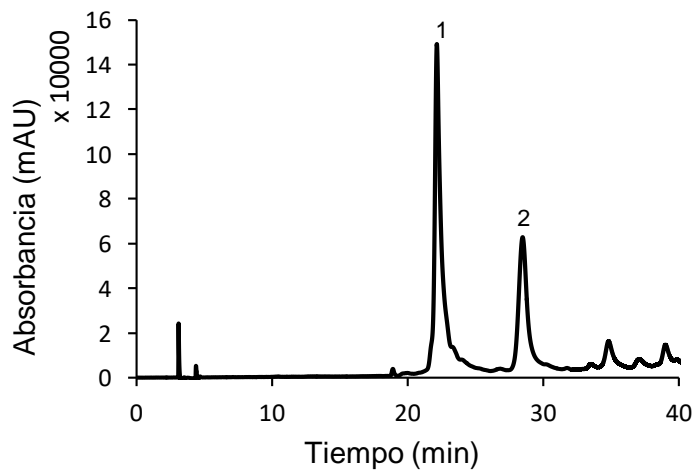


Figura 3. Cromatograma mostrando los picos de las antocianinas obtenido mediante NP-HPLC a 520 nm de una muestra de semilla de cacao no fermentada. Identificación de los picos: 1, cianidin-3- α -L-arabinósido; 2, cianidin-3- β -D-glucósido.

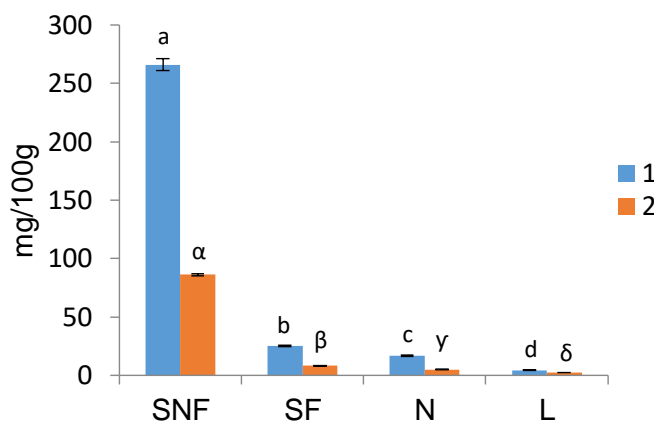


Figura 4. Concentración de antocianinas obtenida mediante NP-HPLC a 520 nm para semilla de cacao no fermentada (SNF), semilla de cacao fermentada (SF), virutas de cacao (N) y licor de cacao (L). Diferentes letras para una misma serie indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). 1, cianidin-3- α -L-arabinósido; 2, cianidin-3- β -D-glucósido.

Los cromatogramas obtenidos a 280 nm de muestras que abarcan todos los pasos del procesado se muestran en la **Figura 5**. En estas condiciones, los analitos identificados fueron los monómeros (solapados), así como los dímeros, trímeros y demás oligómeros de catequina y epicatequina, conocidos como proantocianidinas. El contenido en cada una de estas especies químicas se muestra en la **Tabla 1**. Como puede apreciarse, el contenido en proantocianidinas en la semilla no fermentada fue el más elevado de manera estadísticamente significativa ($p < 0.01$). En esta muestra, fue posible la identificación de todos los oligómeros (desde monómeros hasta decámeros), siendo el contenido de cada uno de ellos estadísticamente superior ($p < 0.01$) al del resto de muestras. La mayor disminución en el contenido de proantocianidinas se evidencia durante la fermentación, registrándose para la muestra de semilla fermentada una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.01$) del contenido de monómeros y dímeros del 75% y del 60%, respectivamente. Este descenso continuó, aunque en menores proporciones tras la obtención de virutas de cacao y licor de cacao. En las muestras de cacao naturales, el contenido en proantocianidinas totales supuso alrededor del 10% del encontrado en la semilla no fermentada, y este sigue disminuyendo hasta alcanzar valores cercanos al 0-1% en las muestras de cacao negro.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores para diferentes productos de cacao. En licor de cacao, Adamson *et al.* (1999) encontraron 200 mg/100g de monómeros, en consonancia con Natsume *et al.* (2000), quienes encontraron 230 mg/100g. En cacao en polvo con distinto grado de alcalinización, Andrés-LaCueva *et al.* (2008) determinaron que la alcalinización del polvo de cacao provocó pérdidas del 50% en los monómeros (36% para catequina y 67% para epicatequina), 69% para los dímeros, 67% para los trímeros y 31% para los tetrámeros. Pese a estos esfuerzos por establecer la relación entre el procesado y el contenido en proantocianidinas en cacao son todavía escasos los trabajos que abordan el análisis de todos los grados de polimerización en muestras de cacao en polvo con distinto grados de alcalinización.

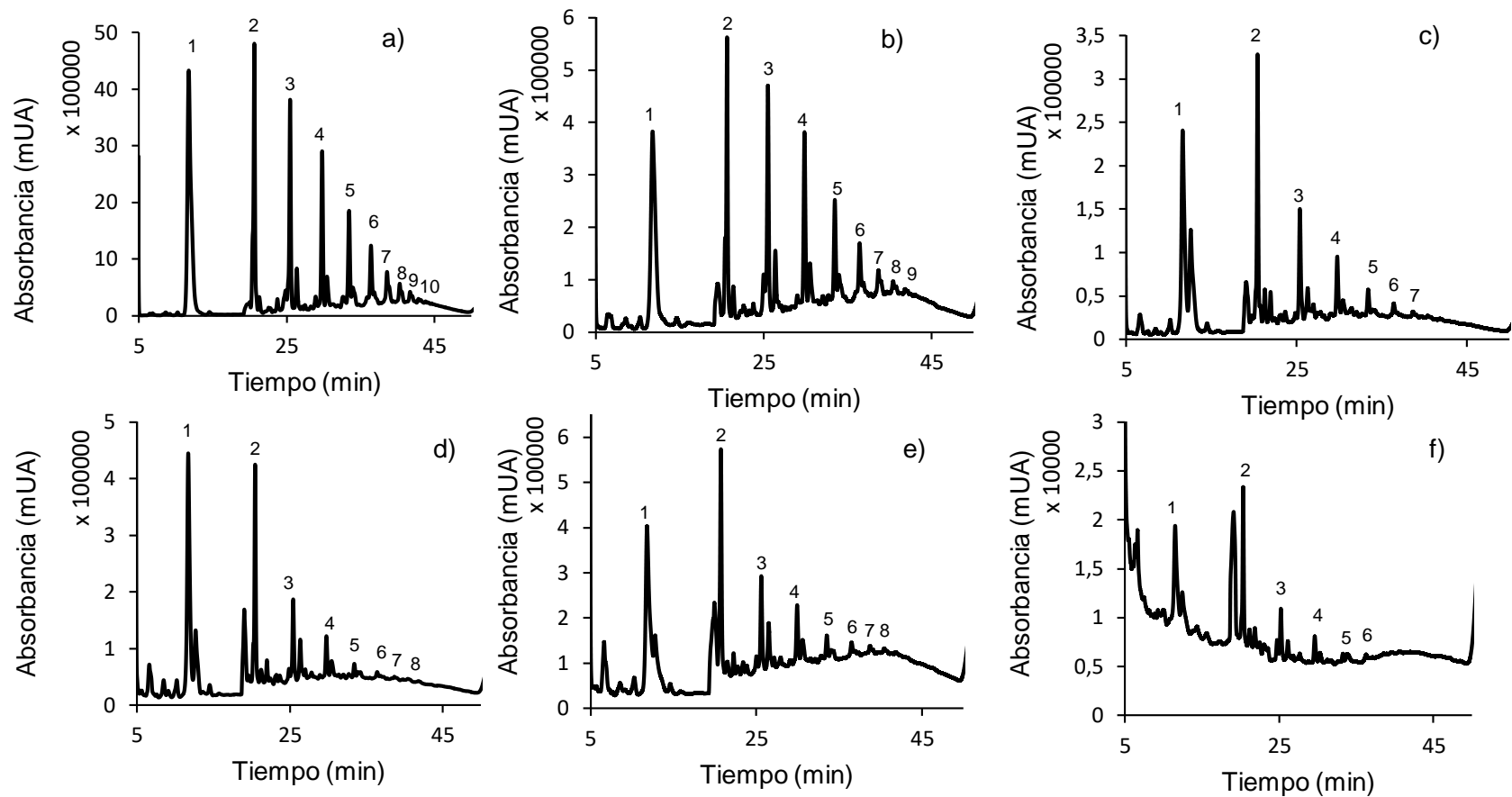


Figura 5. Cromatogramas mostrando los picos de las proantocianidinas obtenidos mediante NP-HPLC a 280 nm de (A) una muestra de semilla de cacao no fermentada, (B) semilla fermentada, (C) nib, (D) licor, (E) cacao natural y (F) cacao negro. Identificación de los picos: 1, monómeros; 2, dímeros; 3, trímeros; 4, tetrámeros, 5, pentámeros; 6, hexámeros; 7, heptámeros; 8, octámeros; 9, nonámeros y 10, decámeros.

Tabla 1. Concentraciones de proantocianidinas (expresadas como mg de epicatequina por 100 g de cacao) para cada una de las muestras estudiadas en este trabajo.

Muestras	Monómeros	Dímeros	Trímeros	Tetrámeros	Pentámeros	Hexámeros	Heptámeros	Octámeros	Nonámeros	Decámeros	Suma
SNF	1712±49	877±19	917±45	673±14	485±17	305±6	160±3	90±3	56±2	20±3	5296±319
SF	458±19	338±14	252±9	199±4	140±3	86±3	50±2	32±2	15,9±0,8	-	1572±114
N	169±6	126±6	70±2	40,4±0,7	12,5±0,3	4,9±0,2	7,2±0,4	-	-	-	389±30
L	132±7	87±2	69±2	51±2	40±2	26±2	13,2±0,5	7,0±0,2	4,4±0,2	-	429±33
NA1	101±4	86±2	19,5±0,7	9,6±0,2	4,5±0,2	3,32±0,07	2,04±0,04	-	-	-	227±15
NA2	222±9	221±6	62±2	23±2	11,1±0,2	4,5±0,2	-	-	-	-	544±37
NA3	196±6	182±9	68±3	40±2	21,5±0,6	11,8±0,4	7,2±0,4	-	-	-	526±40
NA4	143±6	132±7	43±2	21±2	7,2±0,3	-	-	-	-	-	346±31
NA5	301±13	249±9	117±3	68±3	32±2	11,0±0,2	-	-	-	-	777±59
AS1	111±2	82±2	39,0±0,2	8,9±0,2	1,04±0,04	-	-	-	-	-	213±10
AS2	197±10	216±5	63±2	32,9±0,7	8,5±0,4	-	-	-	-	-	517±34,4
AS3	105±4	90±3	19,7±0,6	12,8±0,5	6,1±0,2	3,1±0,2	-	-	-	-	237±59,1
AS4	80±2	70±3	19,7±0,9	9,1±0,4	4,26±0,09	1,60±0,03	-	-	-	-	185±10,2
AM1	109±5	96±3	20,9±0,4	10,5±0,2	4,5±0,2	-	-	-	-	-	241±34,4
AM2	75±3	66±2	17,8±0,5	11,7±0,3	7,4±0,4	5,4±0,2	3,5±0,2	2,5±0,2	1,09±0,04	-	190±11,3
AM3	26±2	48±2	15,1±0,2	4,4±0,2	1,9±0,2	0,66±0,03	0,37±0,02	-	-	-	86±7,74
AM4	60±2	43±2	26,4±0,2	4,7±0,2	0,67±0,03	1,07±0,02	-	-	-	-	115±7
AF1	48±2	53±3	7,9±0,3	1,68±0,04	-	-	-	-	-	-	110±9
AF2	12,4±0,3	14,3±0,5	2,93±0,06	1,66±0,06	0,76±0,03	-	-	-	-	-	32±2
AF3	83±4	85±2	22,7±0,6	7,7±0,2	3,9±0,2	2,32±0,07	-	-	-	-	205±15
AF4	66±2	89±4	16,4±0,3	7,2±0,2	4,6±0,2	1,66±0,08	-	-	-	-	185±14
AF5	47±2	15,8±0,6	2,9±0,2	1,12±0,05	1,37±0,05	0,25±0,02	-	-	-	-	68±6
AF6	124±5	158±4	40±2	9,4±0,5	4,0±0,2	1,73±0,06	-	-	-	-	337±24
AF7	93±3	111±4	21,5±0,5	1,31±0,05	-	-	-	-	-	-	227±15
AF8	34,3±0,7	35±2	8±2	3,3±0,2	1,89±0,04	0,65±0,03	0,46±0,02	-	-	-	846±47
B1	4,6±0,2	7,6±0,4	2,09±0,11	0,73±0,02	0,41±0,01	0,30±0,02	-	-	-	-	16±15
B2	28,9±0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58±4

SNF: semilla no fermentada, SF: semilla fermentada, N: virutas de cacao, L: licor, NA: cacao natural, AS: cacao alcalino suave, AM: cacao alcalino medio, AF: cacao alcalino fuerte, B: cacao negro.

3.5.2. Determinación del contenido de los flavanoles catequina y epicatequina

Como se observa en la **Figura 5**, en NP-HPLC coeluyen los monómeros de catequina y epicatequina. Por ese motivo, las muestras fueron analizadas posteriormente mediante HPLC en fase reversa (RP-HPLC) (Ortega *et al.*, 2008a). En estas condiciones, tal y como se observa en la **Figura 6**, los picos de catequina y epicatequina están bien resueltos, permitiendo la cuantificación por separado de cada analito.

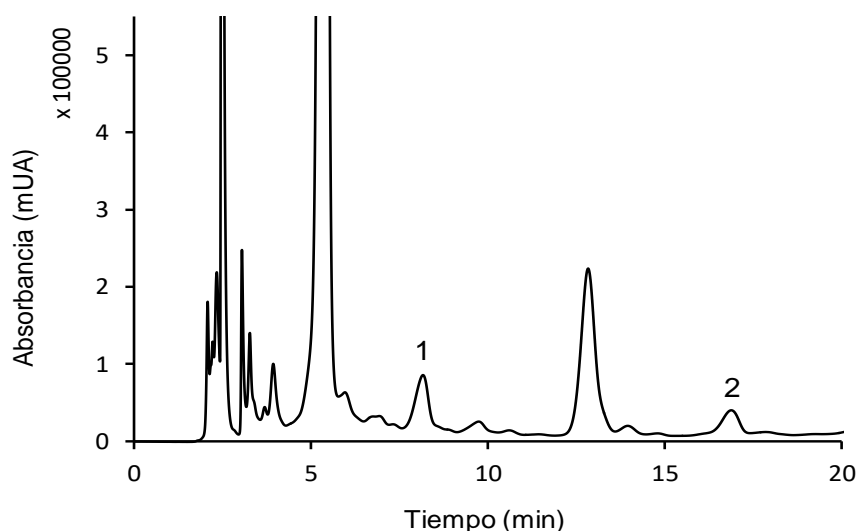


FIGURA 6. Cromatograma mostrando los picos de la catequina y la epicatequina de una muestra de semilla de cacao no fermentada obtenido mediante RP-HPLC a 280 nm. Identificación de los picos: 1, catequina; 2, epicatequina.

El contenido de catequina y epicatequina encontrado en las 27 muestras incluidas en este estudio se muestra en la **Tabla 2**. Como se puede observar en esta tabla, los valores de flavanoles más elevados se observaron en la muestra de semilla de cacao no fermentada. Para esta muestra, la suma de catequina y epicatequina supone alrededor de 1,5g/100 g msd. Este valor tan alto es debido en gran parte al contenido en epicatequina el cual asciende a 1,41 g/100 g msd, de manera que el cociente epicatequina/catequina es de alrededor de 17. Valores similares han sido reportado por otros autores (Brunetto *et.al*, 2007; Risner *et al.*, 2008; Elwers *et al.*, 2009; Payne *et. al*, 2010).

En la semilla fermentada, el contenido en flavanoles no sólo es casi un 80% inferior que en la semilla no fermentada, sino que el cociente epicatequina/catequina disminuye hasta un valor cercano a 2. Estos resultados se observan en el estudio de Payne *et al.* (2010), en el que se refleja un descenso del 85% de la epicatequina tras la fermentación (86% de pérdida de epicatequina en este estudio); además, se observa que la catequina no varía en gran medida durante la fermentación, por lo que se

concluye que el monómero más sensible en esta etapa es la epicatequina. La disminución del contenido de catequina y epicatequina durante la fermentación se debe principalmente a que estos polifenoles son oxidados a quinonas por reacciones bioquímicas al acomplejarse con aminoácidos, péptidos y proteínas y polimerizar con otros polifenoles y formar taninos (Rodríguez *et al.*, 2009).

Tabla 2. Concentraciones de catequina y epicatequina obtenidas mediante RP-HPLC para cada una de las muestras estudiadas en este trabajo.

Muestras	Catequina (mg/100 g msd)	Epicatequina (mg/100 g msd)	Cociente epicat/cat	Catequina+epicatequina (mg/100 g msd)
SNF	84±2	1405±14	16,68	1489±16
SF	83,1±0,2	197±5	2,37	280±6
N	97±4	161±8	1,67	258±12
L	88±2	84±2	0,95	172±3
NA1	59±2	59±3	1,00	118±4
NA2	83,8±0,8	93,6±0,9	1,12	177±2
NA3	104±4	178±5	1,72	279±10
NA4	96±2	96±4	1,00	193±5
NA5	74±2	91±3	1,24	164±4
AS1	114±6	82±3	0,71	196±9
AS2	93±2	63,9±0,6	0,68	157±3
AS3	50±2	40,2±0,8	0,80	91±3
AS4	65±3	50,2±1,3	0,77	115±4
AM1	79±2	58±2	0,73	137±4
AM2	65,9±0,7	47±2	0,72	113±4
AM3	15,3±0,2	9,43±0,09	0,62	24,7±0,2
AM4	44±2	20,5±0,6	0,47	64±3
AF1	51±2	24,3±0,5	0,48	75±2
AF2	7,9±0,2	4,34±0,04	0,55	12,3±0,2
AF3	42±2	42,7±0,8	1,01	85±2
AF4	45,3±0,4	41,1±0,8	0,91	96±2
AF5	17,7±0,7	13,4±0,7	0,76	31±2
AF6	75,1±0,7	48±2	0,64	123±2,2
AF7	67±3	48±2	0,72	115±4
AF8	25,2±0,7	16,0±0,8	0,63	41±2
B1	2,3±0,2	3,3±0,2	1,41	5,6±0,2
B2	12,0±0,4	5,9±0,2	0,49	18,0±0,6
B3	2,18±0,09	0,89±0,04	0,41	3,1±0,2

SNF: semilla no fermentada, SF: semilla fermentada, N: virutas de cacao, L: licor, NA: cacao natural, AS: cacao alcalino suave, AM: cacao alcalino medio, AF: cacao alcalino fuerte, B: cacao negro.

Se ha observado que, tras el procesado del cacao, el cociente de epicatequina/catequina continúa descendiendo, afectando de manera principal a la epicatequina tal y como ocurre en el estudio de Bustamante *et al.* (2015) durante la etapa de tostado.

La **Tabla 2** también muestra los contenidos de catequina y epicatequina en una colección de 24 muestras de cacao en polvo con distintos grados de alcalinización. Para las muestras de cacao natural los contenidos en catequina

oscilaron entre 58,78-103,70 mg/100 g msd, mientras que las de epicatequina oscilaron entre 58,88-178,03 mg/100 g msd. Estos valores fueron disminuyendo de manera estadísticamente significativa ($p < 0.01$) a lo largo del proceso de alcalinización hasta alcanzar valores mínimos en las muestras de cacao negro (2,18-12,04 mg/100 g msd, y 0,89-5,94 mg/100g msd para catequina y epicatequina, respectivamente). Estos resultados se correlacionan con otros estudios (Payne *et al.*, 2010) donde se observan valores de 223 mg/100 g msd de epicatequina y 88 mg/100 g msd de catequina para muestras de cacao naturales y de 4 mg/100 g msd epicatequina y 9 mg/100 g msd de catequina en muestras de cacao alcalinas fuertes. También se observa este descenso del contenido de los flavanoles debido a la alcalinización en otros estudios como el de Li *et al.* (2012) en el que se observa un descenso del 77% de epicatequina y del 67% de catequina durante la alcalinización. En todos los estudios se observa un descenso más severo de la epicatequina, tal y como ocurre en este estudio.

De esta manera se puede concluir que a medida que avanza el procesado del cacao, se aprecia un mayor descenso del contenido en estos flavanoles, especialmente de epicatequina, durante las etapas del procesado del cacao, principalmente fermentación, tostado y alcalinización del cacao.

4. CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo se han puesto a punto métodos analíticos que han permitido cuantificar el contenido de tres familias de flavonoides diferentes como son las antocianinas, las proantocianidinas y los flavanoles.

Estos métodos se han utilizado para caracterizar una colección de 27 productos de cacao, desde la semilla no fermentada hasta cacaos en polvo con distinto grado de alcalinización.

Durante el análisis de las muestras, se ha observado que durante el procesado disminuye el contenido en polifenoles totales, como consecuencia de la disminución de todas y cada una de las familias de flavonoides que componen la fracción soluble de polifenoles. De todas las etapas, la fermentación es la etapa responsable de la disminución más drástica del contenido polifenólico. No obstante, es una etapa inevitable si se quiere conseguir un producto aceptable organolépticamente. Tras la fermentación, la alcalinización es la etapa que más afecta al contenido polifenólico.

Este es el primer trabajo que aborda de manera global la caracterización del perfil polifenólico de los productos del cacao, desde la semilla no fermentada hasta el cacao en polvo con alto grado de alcalinización. Por tanto, por primera vez es posible comparar los valores entre muestras de distintas etapas de procesado sin que haya divergencia en los métodos de extracción, métodos de análisis y forma de expresar los resultados.

5. REFERENCIAS

- Adamson, G., Lazarus, S., Mitchell, A., Prior, R., Cao, G., Jacobs, P., Kremers, B., Hammerstone, J., Rucker, R., Ritter, K., Schimtz, H. (1999). HPLC Method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4184-4188
- Andrés-Lacueva, C., Monagas, M., Khan, N., Izquierdo-Pulido, M., Urpi-Sarda, M., Permanyer, J., & Lamuela-Raventos, R. M. (2008). Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3111-3117.
- Bordiga, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coisson, J., Mazza, G., Arlorio, M. (2015) Evaluation of the effect of processin on cocoa polyphenols: antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate. *International Journal of Food Science and Technology* 50, 840-848
- del Rosario Brunetto, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., & Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100(2), 459-467.
- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., Lieberei, R. (2009) Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.) *Europe Food Research Technology* 229, 937-948
- Fontes, J., Leite, P., Soares, S., Bispo, E. (2015) Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology* 35 (2), 274-289
- Hammerstone, J., Lazarus, S., Mitchell, A., Rucker, R., Schimtz, H. (1999). Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 490-496.
- Hellstrom, J., Mattila, P.H. (2008). HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7616-7624.
- Hii, C.L., Law, C.L., Suzannah, S., Misnawi, Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2(04), 702-722.
- Jonfia-Essien, W. A., West, G., Alderson, P. G., & Tucker, G. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food chemistry*, 108(3), 1155-1159.
- Keen, C. L. (2001). Chocolate: food as medicine/medicine as food. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(sup5), 436S-439S.
- Li, Y., Feng, Y., Zhu, S., Luo, C., Ma, J., Zhong, F. (2012) The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 17-23
- Martin, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Granado Serrano, A. B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., Goya, L. (2008). Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7765-7772
- Miller, K. B., Hurst, W. J., Payne, M. J., Stuart, D. A., Apgar, J., Sweigart, D. S., Ou, B. (2008). Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8527-8533.
- Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T., & Yoshida, T. (2000). Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64 (12), 2581-2587.
- Nazario, O., Ordoñez, E., Mandujano, Y., Arévalo, J. (2014) Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial de licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. *Investigación y Amazonía*; 3 (1), 51-59
- Nazaruddin, R., Seng, L.K, Hassan, O., Said, M. (2007). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa bean (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products* 24, 87-94

- Ortega, N., Paz-Romero, M., Macia, A., Reguant, J., Angles, N., Morelló, J., Motilva, M. (2008a) Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determinate procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 298-305
- Ortega, N., Romero, M., Macia, A., Reuant, J., Angles, N., Morelló, J.R., Motilva, M.J. (2008b) Obtention and characterization of phenolics extracts from different cocoa sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9621-9627
- Ozguven, M., Berktaş, I., Özçelik, B. (2016) Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *Food Science and Technology* 72, 559-565
- Padilla, F. C., Rincón, A. M., & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 58(3), 303-308.
- Payne, M. J., Hurst, W. J., Miller, K. B., Rank, C., & Stuart, D. A. (2010). Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (19), 10518-10527.
- Redovnikovic, I., Delonga, K., Mazor, S., Dragovic-Uzelac, V., Caric, M., Vorkapic-Furac, J. (2009). Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech Journal Food Science* 5, 330-337
- Risner, C. (2008). Simultaneous determination of theobromine, (+) catechin, caffeine and (-) epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa bean and cocoa butter. *Journal of Chromatographic Science* 46, 892-899
- Rodríguez, P., Pérez, E., & Guzmán, R. (2009). Effect of the types and concentrations of alkali on the color of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7), 1186-1194.
- Stahl, L., Miller, K.B., Apgar, J., Sweigart, D.S., Stuart, D.A., McHale, N., Ou, B., Kondo, M., Wurst, W.J. (2009) Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *Journal of Food Science* 74 (6), 456-461
- Stanley, H., Smithson, A., Neilson, A., Anantheswaran, R.C., Lambert, J.D. 2015. Analysis of cocoa proanthocyanidins using reversed phase high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: application to studies on the effect of alkaline processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 5970-5975
- Todorovic, V., Redovnikovic, I. R., Todorovic, Z., Jankovic, G., Dodevska, M., & Sobajic, S. (2015). Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 137-143.
- Todorovic, V., Milenkovic, M., Vidovic, B., Todorovic, Z., Sobajic, S. (2017) Correlation between antimicrobial, antioxidant activity, and polyphenols of alkalized/non-alkalized cocoa powder. *Journal of Food Science* 82(4), 1020-1027
- Visioli, F., Bernaert, H., Corti, R., Ferri, C., Heptinstall, S., Molinari, E., & Violi, F. (2009). Chocolate, lifestyle, and health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(4), 299-312.
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000). Review of polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33, 423-447
- 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.