



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**ESTUDIO DEL VALOR NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE
CACAO EN POLVO CON DIFERENTES GRADOS DE
ALCALINIZACIÓN**

MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

Nombre del Alumno: Sonia Durá Esteve

Directores: José Manuel Barat Baviera

Ana Fuentes López

Director del trabajo experimental: Édgar Pérez Esteve

Centro: Departamento de Tecnología de Alimentos (UPV)

ESTUDIO DEL VALOR NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE CACAO EN POLVO CON DIFERENTES GRADOS DE ALCALINIZACIÓN

Sonia Durá Esteve¹, Édgar Pérez Esteve¹, Ana Fuentes López, José Manuel Barat Baviera¹

ABSTRACT

Cocoa powder is the product obtained by milling the cocoa cake after pressing and removal of fat. This product is considered an essential raw material in the manufacture of biscuits, cakes and bakery products, ice cream and chocolate drinks because of its colour and flavour capability. During processing, cocoa powder can be alkalized in order to neutralize the pH and to develop flavours and colour. Result of chemical reactions occurred during alkalization are a certain components of the sample can be affected as a result of the chemical reaction that give rise to flavour and colour development, thus modifying the nutritional and functional profile of cocoa powders. This work aims to characterize the chemical composition of different cocoa powders with different alkalization degrees, emphasizing those parameters affecting nutritional and functional profile. The results show that the alkalization process does not affect the nutritional profile but is able to diminish the antioxidant capacity of the product. Despite this decline, the analysed cocoa samples have higher antioxidant capacity than samples analysed in other works.

KEY WORDS: Cocoa, alkalization, nutritional and functional profile.

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. 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. Durante el procesado del cacao el polvo se puede aplicar un proceso de alcalinización que tiene por objetivo neutralizar el pH y desarrollar aromas y color. Consecuencia de las reacciones químicas que

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n. Apdo. Correos 22012, 46071. Valencia. España.

dan lugar al desarrollo de aroma y color, ciertos componentes de la muestra pueden verse afectados, modificándose por tanto el perfil nutricional y funcional de los polvos de cacao. El presente trabajo tiene por objetivo caracterizar la composición química de diferentes polvos de cacao con distintos grados de alcalinización, haciendo hincapié en aquellos parámetros que afectan al perfil nutricional y funcional. Los resultados obtenidos demuestran que el proceso de alcalinización no afecta al perfil nutricional pero sí a la capacidad antioxidante del producto. Pese a esta disminución, las muestras analizadas poseen una capacidad antioxidante superior a muestras analizadas en otros trabajos.

PALABRAS CLAVE: Cacao, alcalinización, perfil nutricional y funcional.

RESUM

El cacao en pols és el producte obtingut de la mòlta de la coca de cacao després del premsatge i eliminació del greix. Aquest producte es considera una matèria primera essencial en la fabricació de galetes, coques i productes de panaderia, gelats i begudes de xocolate a causa de la seua capacitat per a donar sabor i color. Durant el processament del cacao en pols es pot aplicar un procés d'alcalinització que té per objectiu neutralitzar el pH i desenvolupar aromes i color. Com a conseqüència de les reaccions químiques que donen lloc al desenvolupament d'aroma i color, certs components de la mostra poden veure's afectats, la qual cosa modifica tant el perfil nutricional i funcional del cacao en pols. El present treball té per objectiu caracteritzar la composició química de diferents cacaos en pols amb diferent grau d'alcalinització, posant l'accent en aquells paràmetres que afecten al perfil nutricional i funcional. Els resultats obtinguts demostren que el procés d'alcalinització no afecta al perfil nutricional però sí a la capacitat antioxidant del producte. Malgrat aquesta disminució, les mostres analitzades posseeixen una capacitat antioxidant superior a altres mostres analitzades en altres treballs.

PARAULES CLAU: Cacao, alcalinització, perfil nutricional i funcional.

INTRODUCCIÓN

El cacao en polvo, producto obtenido del haba de cacao (*Theobroma cacao*) tras eliminar la grasa y moler hasta un tamaño de partícula muy fino, es una materia prima de gran importancia en la industria alimentaria. Entre sus aplicaciones se encuentra la elaboración galletas, tortas y otros productos de panadería y repostería, donde el cacao en polvo aporta el sabor y el aroma; la fabricación de bebidas de chocolate; la elaboración de chocolates, coberturas y bombones; así como la aromatización de helados, glaseados, y bebidas (Miller *et al.*, 2008).

Además de sus propiedades sensoriales, el cacao natural en polvo destaca por un gran número de componentes funcionales que cada vez más se asocian con beneficios para la salud cardiovascular. Estas propiedades saludables se le confieren principalmente a los polifenoles antioxidantes presentes en el cacao los cuales están relacionados con un gran número de efectos beneficiosos para la salud (Wollgast y Anklam., 2000). El cacao es rico en compuestos antioxidantes como los polifenoles, los flavonoles son los componentes mayoritarios, entre los que se encuentran proantocianidinas (58-65%), catequinas (29-38%) y antocianidina (1,7-4%) (Biehl y Ziegler, 2003; Wollgast y Anklam, 2000). Estos polifenoles son similares a los que se pueden encontrar en productos como el vino, el té o ciertos vegetales, y contribuyen a la formación de precursores del sabor en el cacao y en el chocolate (Afoakwa *et al.*, 2008).

Entre las propiedades funcionales asociadas al consumo de polifenoles del cacao se encuentra su capacidad antioxidante, siendo capaces 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, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades degenerativas (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). Los polifenoles del cacao han demostrado tener también actividad antimutagénica (Natsume *et al.*, 2000), además de reducir los niveles de 8-hidroxi-20-desoxiguanosina, un biomarcador de daño oxidativo al ADN (Orozco, Wang, y Keen, 2003).

Además de los polifenoles, el cacao natural es rico en otro componente de interés nutricional como es la fibra dietética. Un alto consumo de fibra se asocia con una menor incidencia en trastornos y enfermedades comunes en los países desarrollados tales como trastornos crónicos del intestino, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Teniendo en cuenta los beneficios para la salud asociados con el consumo de fibra dietética y los polifenoles en la dieta, la presencia de ambos componentes bioactivos en los granos de cacao despierta el interés de tal producto como un ingrediente funcional potencial para la industria (Lecumberri *et al.*, 2007).

El cacao natural en polvo puede mejorar sus propiedades sensoriales y/o tecnológicas mediante un proceso conocido desde hace casi 200 años llamado alcalinización. La alcalinización consiste en el tratamiento del haba de cacao, licor del cacao o cacao en polvo con un álcali tal como carbonato sódico o potásico a una presión y temperatura controlada. Las condiciones del proceso pueden variar considerablemente entre diferentes productores y/o productos. No obstante las principales variables de proceso suelen ser el tipo y la cantidad de álcali utilizado, el tiempo de reacción y la temperatura (De Zaan Cocoa, 2013). Tras el tratamiento de alcalinización la humedad añadida a la muestra se elimina mediante un proceso de secado.

Durante la alcalinización el cacao neutraliza su pH reduciendo su acidez, reduce su astringencia debido a la polimerización de flavonoides, aumenta su solubilidad y desarrolla aromas y sabores. Por otra parte, desarrolla colores que van de un marrón claro suave a un marrón más oscuro con tonos rojizos a causa de la reacción entre los pigmentos del cacao y el álcali en presencia de oxígeno (Dyer, 2003). Dependiendo del grado de alcalinización se pueden obtener diferentes polvos de cacao: cacao natural (no alcalinizado), alcalino suave, alcalino medio y cacao fuertemente alcalinizado. El cacao natural tiene un color marrón suave y un sabor ácido, algo astringente. El cacao ligeramente alcalinizado presenta un color más oscuro y un pH más alto debido al proceso de alcalinización. Al eliminar la acidez y la astringencia se realzan los sabores suaves a chocolate. Por último los cacaos fuertemente alcalinizados poseen un color muy oscuro y un sabor más intenso (Kostic, 1997; De Zaan Cocoa, 2013).

Durante la alcalinización tienen lugar numerosas y complicadas reacciones químicas que intervienen en el desarrollo del sabor y color y que pueden derivar en una alteración perfil nutricional y funcional de los polvos de cacao. Por una parte, las proteínas pueden reaccionar con los azúcares a través de reacciones de Maillard (Hoskin y Dimick, 1994). Por otra, la alcalinización favorece la pérdida de la capacidad antioxidante a causa de la oxidación de los polifenoles y su posterior polimerización, la cual da lugar a la formación de quinonas insolubles (Camu *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008).

Numerosos estudios han investigado que las pérdidas que se originan a nivel funcional causadas por el tratamiento de alcalinización son elevadas. En 2006, Gu *et al.*, compararon muestras de polvos de cacao natural con polvos de cacao alcalinizados y concluyeron una pérdida del 78% de los flavonoides. Mazor *et al.*, 2011 determinaron que el proceso de tostado y alcalinización produce una pérdida de 14% y 64 % respectivamente en el contenido total de polifenoles. Sin embargo, dichos estudios apuntan a que la pérdida del valor nutricional y funcional del cacao en polvo sometido a un proceso de alcalinización dependen tanto de la composición de la materia así como de las condiciones de proceso.

En este contexto, el presente estudio tiene por objetivo poner a punto métodos de análisis químico para evaluar el perfil nutricional y funcional de muestras de cacao en polvo natural, así como utilizar los mismos para la caracterización del catálogo de productos de cacao en polvo naturales y alcalinos de una empresa valenciana de producción y comercialización de cacao en polvo.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima y reactivos

Las muestras de cacao incluidas en este estudio fueron proporcionadas por una empresa valenciana. Atendiendo a su etiquetado, los diferentes cacaos se agruparon en 4 categorías, según su grado de alcalinización: natural (**N**), alcalino suave (**AS**), alcalino medio (**AM**), alcalino fuerte (AF) y alcalino fuerte de color negro (**B**). Los códigos asignados a las diferentes muestras analizadas, el grado de alcalinización, así como las características de procesado indicadas por el proveedor se muestran en la **Tabla 1**. La información correspondiente a otras variables de procesado y a las características intrínsecas de la materia prima, como variedad del cacao u origen, no se muestran ya que son información confidencial de la empresa.

Tabla 1. Características de procesado de las distintas muestras de cacao incluidas en el estudio.

Código	Grado alcalinización	Características de procesado
N1, N2	Cacao Natural	Muestras no alcalinizadas
AS1, AS2, AS3	Alcalino Suave	Concentración de álcali 1-3%
AM1, AM2	Alcalino Medio	Concentración de álcali entre 3-5%.
AF1, AF2, AF3	Alcalino Fuerte	Concentración de álcali entre 5-7%.
B	Alcalino Fuerte	Concentración de álcali entre 5-7% y altas presiones y temperaturas

Todos los reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, UK) y Scharlab (Barcelona, Spain). El kit entimático para la determinación de fibra fue proporcionado por Megazime (Wicklow, Irlanda).

2.2 Determinación características físico químicas: pH y color.

El pH extractable de los distintos cacaos en polvo se determinó mediante la suspensión de 10 g de muestra en 100 mL de agua destilada y posterior medida del valor de pH a temperatura ambiente utilizando un pH metro CRISON basic 20+ (Barcelona, España).

La medida instrumental del color extrínseco de las muestras de cacao se realizó con un espectrocolorímetro CR-400 (Konica Minolta, Ramsey, USA). Los resultados fueron expresados utilizando el sistema CIELAB utilizando un iluminante D65 y observador 10°. El análisis se realizó por triplicado para cada una de las muestras.

2.3 Determinación composición centesimal: humedad, proteínas, grasa, fibra, cenizas e hidratos de carbono.

Las determinaciones de humedad, grasa, proteínas, fibra dietética y cenizas se realizaron a partir de los procedimientos: 931.04, 991.36, 928.08, 991.43 y 920.153 descritos por la AOAC (1997). La determinación de hidratos de carbono se realizó por diferencia respecto al contenido de los demás componentes del cacao (FAO y OMS, 1982).

2.4 Azúcares simples

La determinación de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó por cromatografía de intercambio iónico. Para la preparación de la muestra se tomó 1 g de cacao al que se le añadieron 100 mL de agua ultrapura y se llevaron a baño de ultrasonidos durante 10 min. La disolución se filtró a través de un filtro de nylon 0.45 mm y se diluyó con agua ultrapura (1:10 v/v). Las muestras fueron analizadas utilizando un cromatógrafo de intercambio iónico (Compact IC 761, Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland) equipado con un detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD 817 Bioscan, Metrohm, Herisau, Switzerland). Para la separación se utilizó una columna Metrosep CARB1 (Metrohm, Herisau, Switzerland). La fase móvil consistió en hidróxido sódico 100 mM. La identificación y cuantificación de los azúcares se realizó por el método del patrón externo.

2.5 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante

La determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante se realizó a partir de un extracto fenólico hidroalcohólico obtenido según el método descrito por Martín *et al.* (2008), con algunas modificaciones. 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 y se centrifugaron 10000 rpm/15 min/4 °C. Posteriormente, se realizó una segunda extracción con acetona y agua (70:30, v/v). 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 Follin-Ciocalteu (Todorovic *et al.*, 2015). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. La curva de calibración se preparó en el intervalo de concentraciones de 0-1000 mg/L.

La capacidad antioxidante de los extractos fenólicos de las muestras de cacao se determinó por dos métodos diferentes, el ensayo ORAC que mide la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y mediante el método basado en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

El ensayo ORAC determina la capacidad de los antioxidantes presentes en el cacao para inhibir la oxidación de la fluoresceína en presencia de radicales de oxígeno producidos por la descomposición térmica del 2,2'-azobis(2-methylpropanimidamide) (AAPH). El ensayo ORAC se llevó

a cabo según el método descrito por Miller *et al.* (2008) empleando un lector de placas EnSpire (PerkinElmer, Waltham, USA) con filtros de excitación y emisión de 485 y 528 nm, respectivamente. Los valores se expresaron en μ moles de equivalentes de Trolox por g muestra.

Por otra parte, se determinó la capacidad de los extractos fenólicos para captar el radical DPPH, utilizando la metodología de Racolta *et al.* (2014), con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo se adicionaron 0.1 mL de extracto fenólico, 1 mL de etilacetato y 4 mL de DPPH 10^{-4} M; asimismo se preparó un blanco de etilacetato y DPPH. Los tubos se agitaron 10 s y se almacenaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. Finalizado este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras a 515 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de disminución referido al valor de absorción de la solución DPPH de referencia.

2.5.1 Cafeína y teobromina

El contenido en cafeína y teobromina se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método descrito por López *et al.* (2011). Para ello se empleó un cromatógrafo Hitachi LaChrom (Hitachi Ltd., Tokyo, Japón) con detector Ultravioleta (modelo L-2400). Para la separación se utilizó una columna Kromaphase C18 5 μ m (250 mm x 4,6 mm) (Scharlab, Barcelona, España). Las fases móviles estaban formadas por metanol (A) y ácido acético en agua 0.2% (B). La longitud de onda del detector UV fue fijada en 280nm. El programa de elución empleado se detalla en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Programa de elución para el análisis cromatográfico de teobromina y cafeína.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	1.0	20	80
5	1.0	20	80
20	1.0	44	56
21	1.0	20	80
25	1.0	20	80

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 grado de alcalinización 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 físico química: pH y color.

Los valores de pH correspondientes a cada una de las muestras de cacao se muestran en la **Figura 1**. Como puede observarse, los valores de pH de las diferentes muestras estuvieron comprendidos entre de 5.6 y 7.9. Atendiendo a dichos valores las muestras se clasificaron en diferentes grupos según su grado de alcalinización. Miller *et al.* (2008) estableció una clasificación del grado de alcalinización del cacao en función de sus valores de pH: cacao natural (pH 5-6), cacao alcalino suave (pH 6-7.2), cacao alcalino medio (pH 7.2-7.6) y cacao alcalino fuerte (pH > 7.6). La clasificación llevada a cabo en el laboratorio coincidió con la clasificación de productos descrita en el etiquetado de los productos. Debido a que el valor de pH del polvo de cacao alcalinizado viene dado en gran medida por la cantidad y el tipo de álcali utilizado en el procesado (De Zaan Cocoa, 2013), los valores de pH pueden considerarse como un indicador de la intensidad del proceso de alcalinización llevado a cabo en la producción de los distintos productos.

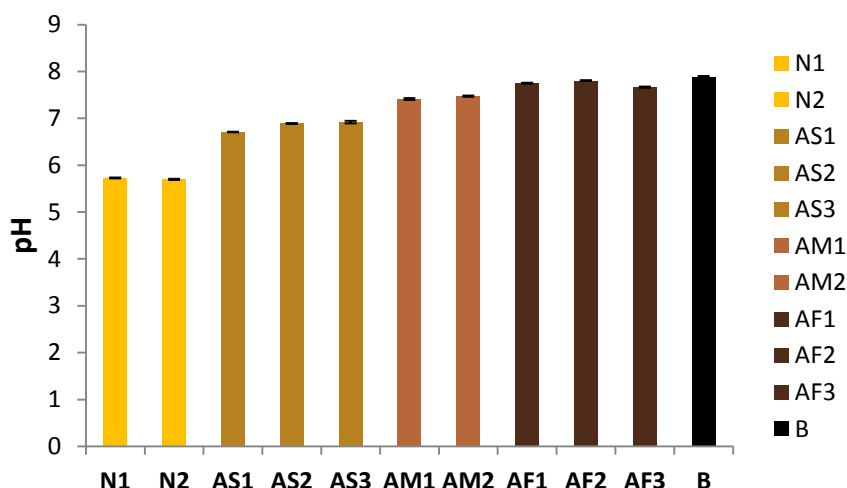


FIGURA 1. Valores (media \pm DS) de pH de los diferentes tipos de cacao.

En la **Figura 2**, se muestran los valores de luminosidad (L^*) para cada una de las muestras de cacao. Los valores de la coordenada L^* oscilaron entre 25 y 50. Como cabía esperar, el valor máximo de luminosidad ($L^*=50$) se encontró en una muestra de cacao natural (**N1**). El valor de L^* disminuye progresivamente en función del grado de alcalinización hasta alcanzar el valor mínimo ($L^*=25$) en la muestra fuertemente alcalinizada, **B** (cacao negro). Las diferencias encontradas en la coordenada L^* entre las muestras de cacao natural, **N1** y **N2** (no sometidas a un proceso de alcalinización) podrían ser debidas a un origen geográfico diferente o a un distinto procesado en las etapas de fermentación o tostado (Afoakwa *et al.*, 2014).

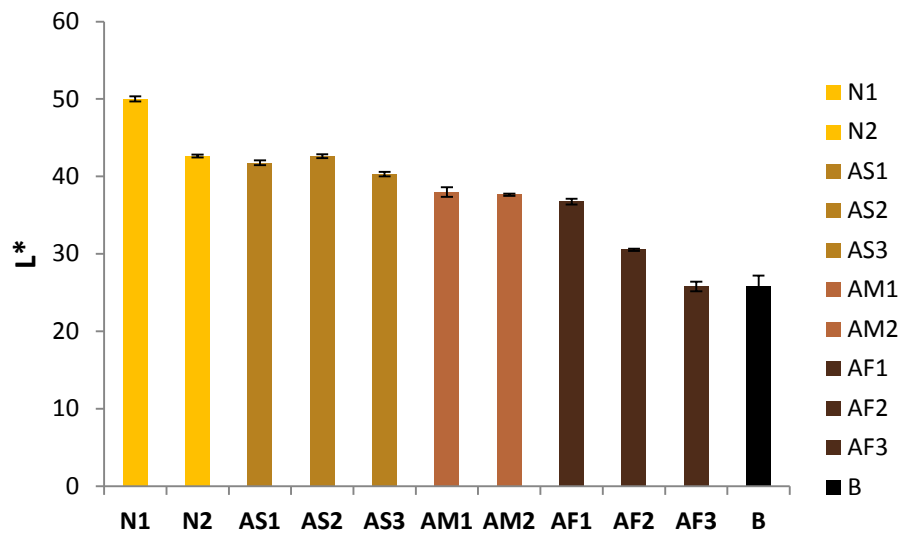


FIGURA 2. Valores (media \pm DS) de luminosidad (L^*) de los diferentes tipos de cacao.

Los valores de la pureza (C^*) determinados en las muestras variaron entre 6 y 25. En la **Figura 3**, se observa como los valores de pureza de color del cacao en polvo disminuyen significativamente cuando este es sometido a un proceso de alcalinización fuerte. En este sentido, podría considerarse que la coordenada cromática C^* nos permite discriminar un elevado grado de alcalinización pero no permite establecer diferencias de color entre los niveles de alcalinización más suaves, lo que podría ser atribuido a que en el círculo cromático los diferentes colores pueden presentar valores de C^* similares aunque su tonalidad sea distinta..

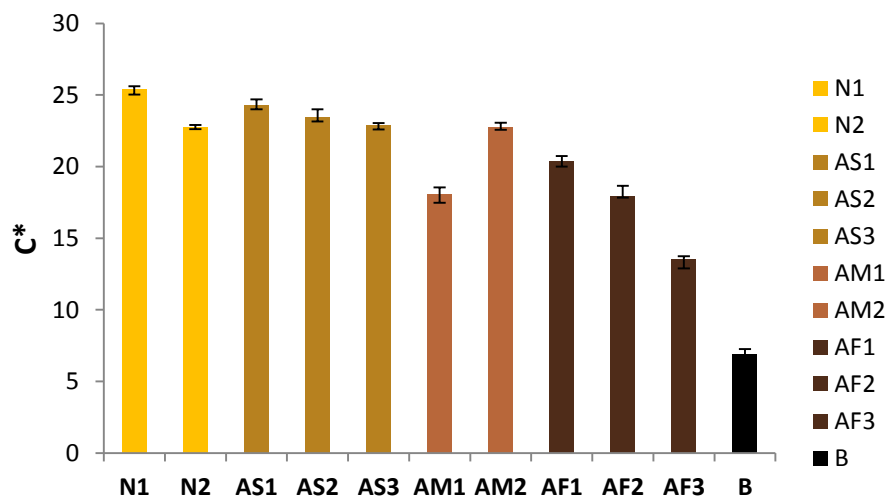


FIGURA 3. Valores (media \pm DS) de la pureza de color (C^*) de los diferentes tipos de cacao.

En la **Figura 4** se muestran los valores de tono para las muestras de cacao con diferente grado de alcalinización. El mínimo valor del tono encontrado (h^*) fue de 47, que se corresponde con el polvo de cacao de alcalinización fuerte **AF3**. Por el contrario, el valor máximo fue de 62, perteneciendo al cacao natural **N1**. Estos datos indican cómo la muestra de cacao evoluciona desde un tono más amarillento ($h^*=90$) propio del cacao natural hasta tonos más rojizos en las muestras alcalinizadas ($h^*=0$). A diferencia de lo ocurrido con la luminosidad y la pureza de color, la tendencia en la evolución del parámetro h^* no es lineal con el incremento en el valor de pH.

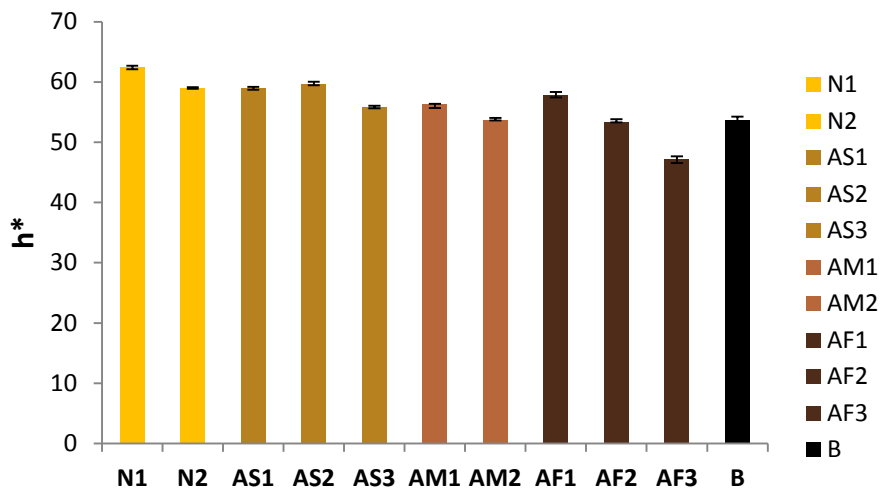


FIGURA 4. Valores (media \pm DS) del tono (h^*) de los diferentes tipos de cacao.

El cacao natural contiene gran número de pigmentos de origen natural (flavonoides) que le confieren su típico color marrón claro. El tipo de pigmentos y su cantidad depende tanto de la variedad del cacao (trinitario, forastero o criollo), del origen geográfico, así como de las diferentes etapas del procesado (fermentación de los granos, tostado, alcalinización...) (ADM cocoa, 2013). Durante la alcalinización, el color del cacao se transforma significativamente, apareciendo tonos rojizos o muy pardos, en función de las condiciones de proceso empleadas. El desarrollo de dichos tonos es consecuencia de la acción del agua y álcali, así como al efecto de las altas temperaturas sobre las proteínas y los polifenoles. Por otra parte, hay que considerar que los polifenoles se oxidan en presencia de agua y oxígeno por acción de la enzima polifenol-oxidasa (PPO), la cual tiene su actividad óptima a pH 8,0 (Rodríguez *et al.*, 2009), produciendo también cambios en el color. Esta enzima actúa oxidando los compuestos fenólicos del cacao, produciendo melanoidinas (compuestos de color marrón). En su estado oxidado los polifenoles tienden a participar en reacciones de polimerización que dan lugar a la aparición de cadenas polifenólicas que a su vez originan pigmentos más oscuros que en sus formas monoméricas. Asimismo, las altas temperaturas favorecen la degradación de proteínas, reacciones de Maillard y dextrinación del almidón que a su vez también contribuyen al color (Afoackwa *et al.*, 2014).

Los datos obtenidos en este estudio, confirmarían que el proceso de alcalinización tiene como consecuencia directa un oscurecimiento del polvo de cacao, tal y como ha sido estudiado por otros autores (Afoakwa *et al.*, 2008). En este sentido, los productos analizados cubren todos los rangos de color posible en un cacao en polvo. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se podría establecer que los valores de pH y color podrían utilizarse para definir el grado de alcalinización de una muestra, y por tanto, a falta de datos precisos sobre variables de proceso, estos valores se utilizarán como referencia para estudiar la influencia de la alcalinización en la evolución del perfil nutricional y funcional.

3.2 Caracterización del perfil nutricional

La composición centesimal calculada para todas las muestras de polvo de cacao se muestra en la **Tabla 3**. Los valores de humedad oscilaron entre 3,06% (**N1**) y 4,71% (**AS1**). Pese a que las diferencias entre los valores de humedad de las diferentes muestras fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$), no se observó una tendencia clara según el grado de alcalinización lo que indicaría que las diferencias observadas serían debidas a otras variables de procesado, como el diferente grado de secado, o a una hidratación posterior al mismo dada la gran higroscopicidad del cacao. A pesar de esta variabilidad, todas las muestras se encontraron por debajo del 5% de humedad. El contenido en humedad máximo permitido en polvos de cacao es del 9% (RD 822/1990). Sin embargo, en la práctica, este porcentaje es muy elevado y puede provocar condensaciones de agua durante el almacenamiento y transporte. Estas condensaciones favorecen al crecimiento de hongos en el producto, además de que el sabor del cacao puede llegar a deteriorarse. Por este motivo, la mayoría de fabricantes consideran que para conseguir la máxima seguridad microbiológica, el contenido de una muestra de cacao debe de ser inferior al 5% (Jayeola y Oluwadun, 2010).

El valor promedio de grasa en las diferentes muestras fue del 11%, no observándose diferencias significativas entre muestras con distinto grado de alcalinización. La homogeneidad en el contenido en grasa entre las muestras se debe a que durante la etapa de prensado las industrias suelen seleccionar la materia prima en función de su contenido graso y a que además durante la alcalinización no se utiliza ningún tipo de disolvente que pueda favorecer la eliminación de la grasa. La mayoría de los cacaos en polvo comerciales contienen entre un 10-24% de grasa, aunque el rango más frecuente de contenido en grasa es del 10-12% (De Zaan Cocoa, 2013). Todas las muestras analizadas se encontraron dentro de este rango. Otros estudios han encontrado el valor del 11% de grasa como el más habitual para muestras de cacao en polvo (Elkhori *et al.*, 2007).

El contenido en proteína determinado por el método Kjeldahl osciló entre 20.9% (**N2**) y 25.8% (**AS2**). Aunque las diferencias entre los valores de contenido proteico entre las diferentes muestras fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$), éstas no se pudieron correlacionar con el grado de alcalinización. Otros autores han encontrado contenidos similares de proteínas, con valores que oscilaron desde (23 a 25%) (De Zaan Cocoa,

2013; Hue *et al.*, 2016), donde las pequeñas diferencias se asocian a la variabilidad en el origen del cacao que influye significativamente en la composición final de proteínas y no al efecto de la alcalinización.

El contenido en hidratos de carbono osciló entre 7.4% y 16.8%. Aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre las diferentes muestras, éstas no estuvieron relacionadas con el grado de alcalinización. Las diferencias en los valores de carbohidratos totales serían debidas a factores propios de la materia prima. La media del contenido en carbohidratos entre las muestras fue de 13%, lo que corresponde con el valor de 12.5% dado por el manual de cacao y chocolate editado por De Zaan (2013).

De todo el contenido en carbohidratos totales alrededor del 1% fueron azúcares simples. La **Tabla 3** muestra la cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa determinadas por HPLC en las diferentes muestras. La sacarosa fue el azúcar simple mayoritario en todas las muestras de cacao, presentando un valor máximo de 0,9% tanto en la muestra **AS2** como en la **AM1**. La glucosa sólo se detectó en tres muestras (**AS3**, **AM1** y **AF1**). En las tres muestras en las que se detectó los valores fueron muy bajos (0.02-0.05 g/100g). Por último, los valores de fructosa oscilaron entre 0.05 y 0.5 g/100g, siendo la muestra **AM2** la que presentó un mayor contenido en este azúcar. Los resultados obtenidos coinciden con los valores presentados por Redgwell *et al.*, (2003) y Tas y Gokmen (2015). Los primeros autores compararon las diferencias en el contenido de azúcares debidas a la materia prima (origen Costa de Marfil, Ecuador y Gana) y al procesado (antes y después de un proceso de tostado) encontrando que el origen de la materia prima condiciona en gran medida el contenido en azúcares y que el proceso de tostado hace disminuir el contenido de azúcares simples hasta en un 40%. Tas y Gokmen (2015) establecieron que el proceso de alcalinización puede afectar al contenido en azúcares simples en el cacao. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio muestran que las diferencias en la materia prima (variedad o tratamientos previos a la alcalinización) son más importantes que la pérdida de azúcares simples a causa de la alcalinización.

Por último, como cabría esperar, las muestras analizadas resultaron ser una fuente importante de fibra. El contenido medio de fibra entre las muestras fue de 32%, lo que coincide con la cantidad publicada en el manual del cacao y chocolate (De Zaan, 2013). La muestra que presentó el menor contenido en fibra (29.3%) fue la muestra **B**, mientras que la muestra que presentó el contenido mayor fue la muestra **AF1** con un 35.5%. Atendiendo a este contenido, el cacao en polvo podría considerarse una fuente dietética de fibra (tanto soluble como insoluble) que ayuda a contribuir a la regulación del tránsito intestinal, aportando sensación de saciedad y retrasando la absorción de azúcares y grasas (Lecumberri *et al.*, 2006).

Tabla 3. Composición de los diferentes tipos de cacao.

	N1	N2	AS1	AS2	AS3	AM1	AM2	AF1	AF2	AF3	B	
Humedad	3.06±0.04 ^a	3.185±0.007	4.7±0.4 ^e	4.49±0.01 ^{de}	4.06±0.02 ^{cd}	3.6±0.1 ^{bc}	3.2±0.3 ^{ab}	4.3±0.4 ^{de}	4.29±0.03 ^{de}	4.4±0.2 ^{de}	3.7±0.6 ^c	***
Grasas	11.0±0.1 ^b	11.0±0.3 ^b	11.2±1.2 ^b	11.1±0.4 ^b	11.06±0.09 ^b	10.5±0.5 ^{ab}	11.0±1.3 ^b	11.6±0.3 ^b	11.20±0.05 ^b	11.52±0.08 ^b	9.5±0.4 ^a	ns
Proteína	24.4±0.6 ^b	20.9±1.5 ^a	24.3±0.5 ^b	25.8±1.4 ^b	25.0±1.2 ^b	25.7±1.3 ^b	25.2±1.3 ^b	22.2±0.5 ^a	25±1 ^b	22.2±0.3 ^a	21.6±0.8 ^a	**
Teobromina	1.58±0.05 ^{de}	1.61±0.07 ^e	1.35±0.05 ^a	1.51±0.03 ^{bcdde}	1.54±0.03 ^{bcdde}	1.46±0.03 ^{abcd}	1.5±0.1 ^{cde}	1.42±0.03 ^{abc}	1.50±0.03 ^{bcdde}	1.33±0.05 ^a	1.42±0.04 ^{ab}	**
Cafeína	0.18±0.01 ^d	0.17±0.03 ^d	0.13±0.01 ^{ab}	0.15±0.03 ^c	0.18±0.09 ^d	0.139±0.008 ^{abc}	0.167±0.008 ^d	0.137±0.004 ^{abc}	0.145±0.00 ^{bc}	0.126±0.006 ^a	0.151±0.003 ^c	***
Carbohidratos totales	15.9±1.4 ^f	15.7±0.5 ^{ef}	12.0±0.6 ^{cd}	8.3±0.7 ^{ab}	14.2±3.5 ^{def}	14.2±1.6 ^{def}	15.9±0.6 ^f	10.5±0.6 ^{bc}	7.4±0.7 ^a	12±1 ^{cde}	16.8±0.6 ^f	*
Azúcares simples	0.935±0.007 ^d	0.3±0.1 ^a	0.31±0.02 ^{ab}	0.9±0.1 ^d	0.50±0.02 ^{bc}	1.0±0.1 ^d	0.7±0.1 ^c	0.58±0.09 ^c	0.63±0.07 ^c	0.54±0.07 ^c	0.70±0.02 ^c	***
Glucosa	nd	nd	nd	nd	0.005±0.007 ^{ab}	0.025±0.007 ^c	nd	0.005±0.007 ^{ab}	nd	nd	nd	***
Fructosa	0.06±0.01 ^{bc}	0.005±0.007 ^a	0.01±0.01 ^a	0.03±0.01 ^{ab}	0.005±0.007 ^a	0.075±0.007 ^c	0.50±0.02 ^d	nd	0.01±0.02 ^a	0.03±0.01 ^{ab}	0.005±0.007 ^a	***
Sacarosa	0.88±0.01 ^{de}	0.3±0.1 ^a	0.30±0.01 ^{ab}	0.9±0.1 ^e	0.50±0.02 ^{bc}	0.9±0.1 ^e	0.18±0.06 ^a	0.58±0.09 ^c	0.62±0.05 ^c	0.51±0.09 ^{bc}	0.69±0.02 ^{cd}	***
Fibra	31±1 ^{abc}	34.0±1.7 ^{bc}	33.6±0.9 ^b	34.3±0.7 ^{bc}	29.4±2.6 ^{abc}	30.6±1.3 ^{abc}	31.4±2.7 ^{abc}	35.5±0.8 ^c	34.5±1.5 ^{bc}	34.0±1.6 ^{bc}	29.3±1.7 ^a	ns
Cenizas	7.02±0.03 ^a	7.13±0.04 ^a	9.3±0.6 ^b	10.10±0.08 ^c	9.3±0.3 ^b	10.9±0.3 ^{de}	10.7±0.3 ^d	10.9±0.07 ^{de}	12.72±0.08 ^f	11.19±0.08 ^e	16.87±0.03 ^g	***

Letras iguales en una misma columna indican la pertenencia a grupos homogéneos.
 Nivel de significación (α): ***($p<0.001$). **($p<0.01$). *($p<0.05$). ns (no significativo).
 nd (no detectado).

Por último, el contenido en cenizas en las muestras osciló entre 7.02% (**N**) y 16.87% (**B**). El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas entre las muestras ($p > 0,001$), de forma que la cantidad de cenizas está relacionada con el grado de alcalinización. De esta manera, cuanto mayor es el grado de alcalinización, mayor es el contenido en cenizas. La muestra **B** presentó una cantidad significativamente mayor de cenizas que otras muestras con valor equivalente de pH debido a que la combinación de sales utilizada para producir cacaos negros suele ser diferente a la que conduce a la producción de otros cacaos alcalinos (Koop *et al.*, 2014).

3.3 Caracterización del perfil funcional

Desde el punto de vista funcional los componentes más interesantes del cacao en polvo son además de la fibra, las metilxantinas (cafeína y teobromina) y los polifenoles.

Las metilxantinas son un grupo de alcaloides estimulantes del sistema nervioso central encontrados sobre todo en cacao, café y té con efecto también en los sistemas gastrointestinal, respiratorio y renal (Li *et al.*, 2012). Las metilxantinas más importantes en los productos provenientes del cacao son la teobromina y la cafeína, aunque también se pueden encontrar trazas de teofilina (del Rosario Brunetto *et al.*, 2007). Dependiendo del grado de fermentación y del tipo de cacao en polvo el contenido en teobromina y cafeína oscila entre 1-3% y 0,1-0,5%, respectivamente. El contenido en metilxantinas en las muestras de cacao en polvo analizadas se muestran en la **Tabla 3**.

Los valores de teobromina oscilaron entre 1,33% (**AF3**) y 1,61% (**N2**). Aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre las diferentes muestras, la falta de una tendencia clara entre el contenido en teobromina y el grado de alcalinización indica que la alcalinización no es la variable que más influyente en el contenido en teobromina de las muestras alcalinizadas. Por su parte, los valores de cafeína oscilaron entre 0,12% (**AF3**) y 0.18% (**AS3**). Al igual que en el caso de la teobromina, aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre las diferentes muestras, éstas no pueden asociarse directamente al efecto de la alcalinización.

La **Figura 5a** muestra el contenido en polifenoles totales de las muestras analizadas. Como puede observarse, el contenido de polifenoles totales en las muestras de cacao natural osciló entre 5.57 (**N1**) y 4.49 (**N2**) g AG/100g. Estos valores coinciden con los valores de polifenoles totales dados por otros autores para muestras de cacao natural (Lecumberri *et al.*, 2007; Padilla *et al.*, 2008; Rivera y Gómez, 2013), donde los valores oscilaron entre 4,0 y 6,6 g ácido gálico/100g de cacao. Atendiendo a la literatura estos polifenoles totales serían la suma de catequinas o flavonoles (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%) (Wollgast y Anklam, 2000). La principal catequina es la epicatequina aunque también se encuentran en cantidades menores catequina, galocatequina y epigalocatequina (Zapata *et al.*, 2013). Las diferencias encontradas respecto

al contenido fenólico entre las muestras podría atribuirse a varios factores entre los que se incluye la diversidad genética (variedad y origen de la muestra) (Nazaruddin *et al.*, 2006), variables ambientales (intensidad de la luz, temperatura y uso de fertilizantes), procesado (fermentación, secado y tostado) y almacenamiento (Zapata *et al.*, 2013).

En la **Figura 5a** se puede observar como el contenido en polifenoles totales está íntimamente relacionado con el grado de alcalinización del cacao de forma que el aumento en el grado de alcalinización reduciría el contenido en polifenoles totales en el cacao. En un estudio realizado por Payne *et al.* (2010) en el que se comparó el contenido en polifenoles de cacao natural con el mismo cacao sometido a un proceso de alcalinización se observó que la alcalinización causó la pérdida de epicatequinas y catequinas de hasta el 98% y 80%, respectivamente. Andrés-Lacueva *et al.* (2008) estableció una reducción de epicatequina y catequina desde 67% al 35% como resultado de la alcalinización del cacao en polvo. En nuestro estudio, en las condiciones más extremas (**B**) el contenido en polifenoles supone una reducción del 57% con respecto al valor de polifenoles totales de la muestra **N1**. Estos resultados demuestran que pese a que la alcalinización hace disminuir el contenido en polifenoles de las muestras, mediante la selección de semillas así como de variables de proceso concretas, se puede minimizar el impacto de la alcalinización sobre el contenido fenólico del producto.

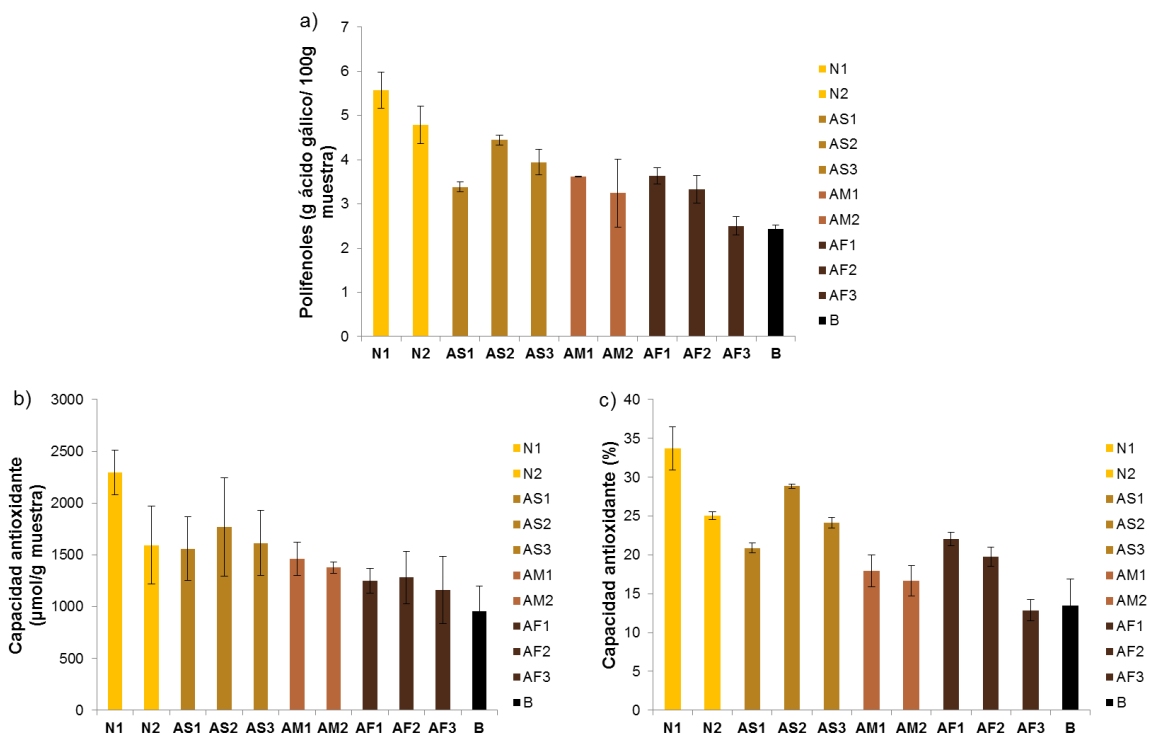


FIGURA 5. Valores (media \pm DE) del contenido en polifenoles totales (a), capacidad antioxidante determinada por el método ORAC (b) y capacidad antioxidante determinada por el método DPPH (c) en los diferentes tipos de cacao.

Debido a la falta de un método normalizado para caracterizar las propiedades antioxidantes del polvo de cacao, esta propiedad se determinó por dos de los métodos más empleados para determinar la capacidad antioxidante en extractos hidrosolubles: método ORAC y método DPPH.

Los valores de la actividad antioxidante, evaluados por el método ORAC, en las dos muestras cacao natural fueron significativamente diferentes ($p > 0,001$). Los mayores valores fueron para la muestra **N1** (2296 μ moles de Trolox/ g cacao), mientras que la muestra **N2** presentó un valor de 1593 μ moles de Trolox/ g cacao (**N2**) (**Figura 5b**). Los valores de capacidad antioxidante publicados en la literatura científica muestran también una amplia variabilidad en este parámetro, con valores que van desde los 620 μ moles de Trolox equivalente/ g (Martin *et al.*, 2008) hasta los 2873 μ moles de Trolox/ g cacao, dados por Zapata *et al.* (2013) para cacao de origen Colombiano fermentado. Otros autores y marcas de cacao dan valores de 790, 826, 846 y 1377 μ moles de Trolox/ g cacao (Todorovic *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008; Wilderness Family Naturals, 2016).

En general se puede observar que los valores de capacidad antioxidante disminuyen con el grado de la alcalinización de las muestras de cacao siendo los más bajos en la muestra de cacao fuertemente alcalinizada. La pérdida de capacidad antioxidante causada por la alcalinización ha sido descrita también por otros autores (Mazor *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2008). En este sentido, tomando la capacidad antioxidante del cacao **N1** (cacao con una mayor actividad antioxidante) como valor de referencia se calculó un porcentaje de pérdida de la capacidad antioxidante del 30, 40, 50 y 60 % para cacaos alcalinos suaves, cacaos alcalinos medios, cacaos alcalinos fuertes y cacao negro, respectivamente. Sin embargo, estos valores son únicamente orientativos, ya que no se dispone del valor de capacidad antioxidante de la materia prima correspondiente a cada muestra. En este sentido, sería interesante realizar nuevas investigaciones que nos permitieran cuantificar exactamente la pérdida de capacidad antioxidante según las condiciones de procesado. La información recogida en estos estudios permitiría a la industria por un lado predecir la capacidad antioxidante de sus productos en función de las características de su materia prima y del grado de alcalinización, y por otro lado, ajustar las variables de procesado en función de las características de la materia prima y las que se desean en el producto final.

Los resultados obtenidos en este estudio y la gran variabilidad entre los datos consultados en bibliografía parecen indicar que la capacidad antioxidante del cacao se ve afectada por múltiples factores; aunque el grado de alcalinización puede influir en la capacidad antioxidante del producto, hay otros factores que condicionan estos valores por lo que el impacto del procesado sobre este parámetro podría optimizarse mediante una correcta selección de la materia prima y manipulación adecuada del producto previa a su tratamiento de alcalinización.

Por su parte, la actividad antioxidante determinada por el método DPPH (**Figura 5c**) siguió un patrón de comportamiento muy similar al determinado por el método ORAC. Atendiendo a este ensayo, y de manera análoga a lo descrito anteriormente, la alcalinización provocó una pérdida de capacidad antioxidante del 30, 50, 55 y 60% para las muestras de cacao sometidas a alcalinización suave, media, fuerte y para el cacao negro, respectivamente.

Comparando las tres gráficas de la **Figura 5** se puede observar que el patrón de los resultados de contenido en polifenoles totales y capacidad antioxidante determinada por ambos métodos sigue la misma tendencia. Por otra parte, se observa cómo a medida que se incrementa el grado de alcalinización disminuyen ambos, contenido en polifenoles totales y capacidad antioxidante.

Las **Figuras 6a** y **6b** muestran la relación lineal entre el pH y la coordenada L* con el contenido en polifenoles totales, respectivamente. Como puede observarse, la correlación del contenido en polifenoles con el pH ($r^2=0.739$) es inferior a la alcanzada con el parámetro L* ($r^2=0.8211$). Estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad de color encontradas entre las muestras **N1** y **N2**, pese a que poseen un mismo pH. Por otra parte, teniendo en cuenta que el oscurecimiento de la muestra **N2** lleva asociado una pérdida en el contenido en polifenoles, podría decirse que o bien la procedencia geográfica es totalmente distinta a la del cacao **N1** o que la muestra **N2** ha sido sometida a algún tratamiento térmico de oscurecimiento en ausencia de álcali (Afoackwa *et al.*, 2014).

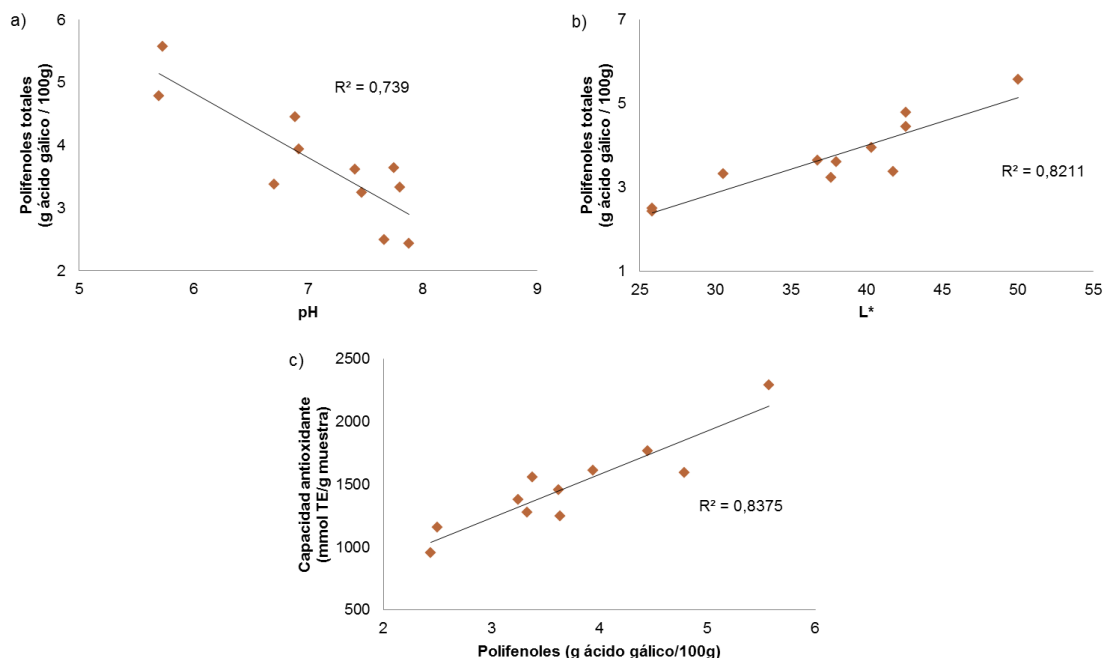


FIGURA 6. Relación entre el pH (a) y coordenada L (b) con el contenido en polifenoles totales. Relación entre el contenido en polifenoles toles y la capacidad antioxidante determinada por el método ORAC (c).

Por último la **Figura 6c** muestra la correlación existente entre el contenido en polifenoles totales y la capacidad antioxidante determinada por el método ORAC. El alto coeficiente de correlación entre ambas variables ($r^2=0.8375$) indica que el contenido en polifenoles totales está directamente relacionado con la capacidad antioxidante, de manera que un mayor contenido en polifenoles conlleva una mayor capacidad antioxidante. Por tanto, una disminución en el contenido en polifenoles a causa de la alcalinización provoca una disminución de la capacidad antioxidante de las muestras. Esta relación entre la alcalinización y el contenido polifenólico total, así como la relación entre el contenido polifenólico total y la capacidad antioxidante ha sido previamente descrita por Othman *et al.* (2007) y Miller *et al.* (2008).

CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo se han puesto a punto métodos analíticos para la caracterización del perfil nutricional y funcional de polvos de cacao, los cuales se utilizarán a partir de ahora para el control rutinario de la composición de las muestras producidas por la empresa valenciana con interés en este estudio.

El análisis de los diferentes polvos de cacao ha permitido comprobar que el proceso de alcalinización condiciona de manera importante el color y pH del producto; sin embargo, no modifica significativamente el perfil nutricional del producto, de forma que tanto el cacao natural como el alcalinado (independientemente del grado de alcalinización) son una excelente fuente de proteínas y fibra. La alcalinización afecta negativamente al contenido en polifenoles totales y a la capacidad antioxidante del cacao. Los resultados recogidos en este trabajo han encontrado una alta variabilidad entre los cacaos naturales, lo que indica que el perfil funcional del producto depende también de otros factores que afecta al cacao en su origen.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el perfil nutricional y funcional de las muestras de cacao en polvo natural y alcalinado proporciona información del elevado interés tanto para las compañías productoras de cacao en polvo, como para industrias alimentarias que usan estos cacaos como ingredientes para la fabricación de sus productos.

REFERENCIAS

Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9), 840-857.

Afoakwa, E. O., Budu, A. S., Mensah-Brown, H., & Felix, J. (2014). Effect of Roasting Conditions on the Browning Index and Appearance Properties of Pulp Pre-Conditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma Cacao*) Beans. *J Nutrition Health Food Sci*, 1(1), 5.

Andres-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.

A.O.A.C. (Association of official analytical chemists) (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.

Biehl, B., & Ziegler, G. (2003). Cocoa: chemistry of processing. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 1436-1448.

Boletín Oficial del Estado (BOE). Real Decreto 822/1990, de 22 de junio, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio del cacao y chocolate.

Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2288-2297.

Rivera, R. E. C., & Gómez, E. S. O. (2013). Polifenoles 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.

De Zaan cocoa, 2013. Cocoa & Chocolate manual. ADM Cocoa, Suiza, 171pp.

del Rosario Brunetto, M., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Galignani, 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.

Dyer, B. (2003). Alkalized cocoa powders. *Manufacturing Confectioner*, 83(6), 47-54.

EIKhori, S., Paré, J. J., Bélanger, J. M., & Pérez, E. (2007). The microwave-assisted process (MAP TM1): Extraction and determination of fat from cocoa powder and cocoa nibs. *Journal of food engineering*, 79(3), 1110-1114.

FAO y OMS (1982). <http://www.fao.org/3/a-y4705s/y4705s02.pdf>. Fecha de consulta: 23 de Enero de 2016.

Gu, L., House, S., Wu, X., Ou, B., Prior, R., 2006. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 54, 4057-4061.

Hoskin, J. C., & Dimick, P. S. (1994). Chemistry of flavour development in chocolate. In *Industrial chocolate manufacture and use* (pp. 102-116). Springer US.

Hue, C., Gunata, Z., Breyse, A., Davrieux, F., Boulanger, R., & Sauvage, F. X. (2016). Impact of fermentation on nitrogenous compounds of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from various origins. *Food chemistry*, 192, 958-964.

Jayeola, C. O., & Oluwadun, A. O. (2010). Mycoflora and nutritional components of cocoa powder samples in South West Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, 5(19), 2694-2698.

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.

Kopp, G. M., Seyller, M., Hennen, J. C., & Brandstetter, B. (2014). *U.S. Patent No. 8,715,766*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Kostic, M. J. (1997). Cocoa alkalization. *Manufacturing Confectioner*, 77, 128-130.

Lecumberri, E., Mateos, R., Ramos, S., Alía, M., Rúperez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación. *Nutrición Hospitalaria*, 21(5), 622-628.

Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rúperez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104(3), 948-954.

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*, 25(1), 17-23.

López, A., Rico, M., Rivero, A., & de Tangil, M. S. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3), 1104-1109.

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.

Mazor Jolić, S., Radojčić Redovniković, I., Marković, K., Ivanec Šipušić, Đ., & Delonga, K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International journal of food science & technology*, 46(9), 1793-1800.

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.

Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1), 87-94.

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.

Orozco, T. J., Wang, J. F., & Keen, C. L. (2003). Chronic consumption of a flavanol and procyanidin rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(2), 104-110.

Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530.

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.

Racolta, E., Muste, S., Muresan, A. E., Muresan, C. C., Bota, M. M., & Muresan, V. (2014). Characterization of Confectionery Spreadable Creams Based on Roasted Sunflower Kernels and Cocoa or Carob Powder. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 71(1), 62-67.

Redgwell, R. J., Trovato, V., & Curti, D. (2003). Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. *Food Chemistry*, 80(4), 511-516.

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.

Taş, N. G., & Gökmen, V. (2015). Effect of alkalization on the Maillard reaction products formed in cocoa during roasting. *Food Research International*.

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.

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.

Wilderness Family Naturals. <http://www.wildernessfamilynaturals.com/category/chocolate-products-raw-cacao.php>. Fecha de consulta: 20 de enero de 2016.

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.

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.