

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**



**Análisis proximal, compuestos fenólicos, alcaloides,  
ácidos grasos y actividad antioxidante de dos lotes de  
Chocolate Piura Milk, Cacaosuyo**

**Estefany Vanesa Bastidas Fernández**

Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico

Lima-Perú

2016

**Asesora**

**Rosario Elena Rojas Durán MD, PhD**

**Miembros del jurado**

**QF. Juan Ramírez Achín**

**QF. Jorge Lescano Bejarano**

**Dra. Luz Pacheco Lechuga**

## **Dedicatoria**

Esta tesis está dedicada a mi madre Juana, por el gran apoyo incondicional que me ha brindado no solo durante este tiempo de realización de la misma, sino durante estos cinco años de carrera; por su paciencia, sus sabios consejos, sus enseñanzas y la ayuda brindada en todo este tiempo.

A mi hermano, pues al igual que mi madre fueron el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación. A mi abuela materna, Hipólita (Q.E.P.D), quien por su lucha y fortaleza me inspira siempre a ser una mejor persona cada día.

## **Agradecimientos**

La realización de esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo sin el apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer.

En primer lugar, agradezco a mi madre por el apoyo moral y económico brindado, por su paciencia y por sus consejos. Gracias por hacer esto posible.

A mi asesora de tesis, PhD Rosario Rojas Durán, cuyo apoyo constante en la experimentación y redacción de esta tesis permitió la culminación de este trabajo. Gracias por su tiempo y su paciencia.

A Candy Ruiz, David Condori, Kirti Patel, Inés Castro y Fabio Espichán, gracias por su apoyo brindado durante la realización de los ensayos experimentales, manejo de instrumentos, provisión de materiales y selección de la metodología más adecuada para cada experimento. Gracias por corregirme y por sus enseñanzas.

A mis amigos, por el apoyo brindado en la realización de los experimentos.

A la empresa Cacaosuyo, por las muestras brindadas para la realización de este trabajo. A Renzo Yachachin por su aporte brindado en la redacción de esta investigación.

A la escuela de Farmacia y Bioquímica y a la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

*Estefany Vanesa Bastidas Fernández*

## Contenido

I.	Introducción.....	12
II.	Marco teórico.....	14
2.1	Procesamiento del cacao.....	14
2.1.1	Recolección del grano de cacao.....	14
2.1.2	Fermentación.....	14
2.1.3	Secado.....	15
2.2	Proceso en planta para la elaboración del chocolate.....	15
2.2.1	Tostado.....	15
2.2.2	Descascarado y molienda.....	15
2.2.3	Refinado y enconchado.....	16
2.2.4	Temperado y cristalizado.....	16
2.3	Análisis Químico Proximal.....	17
2.4	Compuestos fenólicos y actividad antioxidante.....	17
2.5	Ácidos grasos y alcaloides.....	18
III.	Objetivos.....	20
3.1	General.....	20
3.2	Específicos.....	20
IV.	Materiales y Métodos.....	21
4.1	Chocolate de Leche Piura Milk.....	21
4.1.1	Obtención y Tratamiento de la Muestra.....	21
4.2	Análisis Proximal de la Muestra.....	21
4.2.1	Prueba de Humedad.....	21
4.2.2	Determinación de Cenizas.....	22
4.2.3	Determinación de Proteínas (Método de Kjeldahl).....	22
4.2.4	Determinación de Grasas Totales.....	24
4.2.5	Determinación de Fibras Totales.....	25
4.2.6	Determinación de Carbohidratos.....	26
4.3	Determinación del Perfil de Ácidos Grasos.....	27

4.4	Determinación de contenido de compuestos fenólicos.....	27
4.5	Determinación de contenido de cafeína y teobromina.....	28
4.6	Determinación de contenido de catequina y epicatequina.....	29
4.7	Determinación de la actividad antioxidante.....	30
4.7.1	Test de DPPH.....	30
4.8	Análisis Estadístico.....	31
V.	Resultados.....	32
VI.	Discusión.....	41
VII.	Conclusiones.....	45
VIII.	Referencias Bibliográficas.....	46

## Lista de Figuras

<b>Figura N° 01</b>	Cromatogramas de gases del perfil de ácidos grasos del chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo.....33
<b>Figura N° 02</b>	Curva estándar de ácido gálico.....34
<b>Figura N° 03</b>	Curva de calibración de teobromina.....35
<b>Figura N° 04</b>	Curva calibración de cafeína.....36
<b>Figura N° 05</b>	Curva de calibración de catequina.....37
<b>Figura N° 06</b>	Curva de calibración de epicatequina.....37
<b>Figura N° 07</b>	Curvas de % Neutralización de radicales DPPH vs concentración del chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo.....39
<b>Figura N° 08</b>	Curva de calibración de ácido ascórbico.....40

## Lista de Tablas

<b>Tabla N° 01</b>	Análisis proximal del chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo.....	32
<b>Tabla N° 02</b>	Perfil de ácidos grasos del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo.....	34
<b>Tabla N° 03</b>	Contenido de compuestos fenólicos totales en el chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo.....	35
<b>Tabla N° 04</b>	Contenido de teobromina y cafeína en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo.....	36
<b>Tabla N° 05</b>	Contenido de catequina y epicatequina en el chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo.....	38



## Abreviaturas

**%** : Porcentaje

**°C** : Grados Celsius

**AG** : Ácido Gálico

**cm** : Centímetros

**DPPH** : 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil

**EC<sub>50</sub>** : Concentración efectiva media

**etc.** : Etcétera

**g** : Gramos

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

**m** : Metros

**mg** : Miligramos

**ml** : Mililitros

**mM** : Milimolar

**min** : Minutos

**nm** : Nanómetros

**N** : Normalidad

**pH** : Potencial de Hidrógeno

**µg** : Microgramos

**µl** : Microlitros

**UV** : Ultravioleta

**µM** : Micromolar

**rpm** : Revoluciones por minuto

## Resumen

El chocolate de leche “Piura Milk – Cacaosuyo” es reconocido a nivel internacional, en el año 2015 recibió el premio al mejor “Chocolate con Leche del Mundo” en “The International Chocolate Awards. El objetivo del presente trabajo fue conocer el potencial nutricional y de actividad antioxidante de dicho chocolate en dos lotes consecutivos de producción.

En el análisis químico-proximal, el contenido de carbohidratos y grasa fue de 44.4 - 46.9% y 42.2 - 39.5%, respectivamente. El perfil de ácidos grasos, determinado por cromatografía de gases, está constituido principalmente por ácido esteárico (33.6-34.8%), oleico (32.5%) y palmítico (30.3-30.9%). El contenido de compuestos fenólicos, determinado por método espectrofotométrico, fue 370.76 - 396.65 mg AG/100 g.

Mediante cromatografía HPLC se determinó el contenido de teobromina (231.8-287.1 mg/100 g) y de cafeína (45.9-71.0 mg/100 g), al igual que el contenido de catequina (18.4-20.5 mg/100 g) y de epicatequina (90.5 -101.5 mg/100 g).

Por otro lado, la actividad antioxidante *in vitro*, determinada por la Concentración efectiva media (test de DPPH) fue  $EC_{50} = 0.39 - 0.48$  mg/ml.

El presente estudio contribuye a la caracterización química y de las propiedades antioxidantes del chocolate de leche “Piura Milk – Cacaosuyo”, el cual puede ser punto de partida para el desarrollo de futuras investigaciones.

## Abstract

The milk chocolate "Piura Milk – Cacaosuyo" is recognized internationally, in 2015 received the award for best "World Milk Chocolate" in "The International Chocolate Awards. The aim of this study was to determine the potential nutritional and antioxidant activity of the chocolate in two consecutive batches of production.

In the proximal chemical analysis, carbohydrate and fat content were 44.4-46.9% and 42.2 - 39.5%, respectively. The fatty acid profile, determined by gas chromatography, consisting principally of stearic (33.6-34.8%), oleic (32.5%) and palmitic acid (30.3-30.9%). Phenolic compounds content, determined by spectrophotometric method was 370.76 - 396.65 mg AG/100 g.

The content of theobromine (231.8-287.1 mg/100 g), caffeine (45.9-71.0 mg/100 g), as well as the catechin (18.4-20.5 mg/100 g) and epicatechin content (90.5 -101.5 mg/100 g), were determined by HPLC chromatography.

On the other hand, the antioxidant activity in vitro was measured by the median effective concentration (DPPH test), and it was EC<sub>50</sub> = 0.39 to 0.48 mg/ml.

This study contributes to evaluate the chemical and antioxidant properties of milk chocolate Piura Milk - Cacaosuyo, and it can be a starting point for the development of future research.

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es una de las naciones con mayor calidad en la producción de cacao, de acuerdo con cifras del Minagri (Ministerio de Agricultura) este llegó en el 2011 a los 56.5 mil toneladas, lo que generó alrededor de 5.7 millones de jornales anuales, beneficiando directamente a más de 40 mil familias, e indirectamente a 150,000 personas. La importancia económica y social de la cadena productiva del cacao radica en su aporte al valor bruto de la producción, que durante 2011 fue de 130 millones de nuevos soles. Por su parte, el Perú ha sido calificado por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como un país productor y exportador de cacao fino y de aroma, logrando exportar el 36% del que se produce a nivel mundial.<sup>1</sup>

Por otro lado, el chocolate es un alimento muy complejo y los científicos continúan investigando con el fin de conocer sus posibles beneficios y secretos; cuando se consume, se ha observado que tiene efectos sobre el comportamiento humano y la salud. Durante la última década, varios estudios han informado de que su consumo puede contribuir a la consecución de la salud y el desarrollo óptimos, así como desempeñar un papel importante para reducir el riesgo o retrasar el desarrollo de enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares (ECV), cáncer y otras enfermedades relacionadas con la edad.<sup>2</sup>

El chocolate es un alimento rico en grasas, carbohidratos y proteínas; nutrientes indispensables para aportar energía al organismo humano. Además, su consumo aporta bienestar psicológico debido a su agradable sabor. Este alimento aporta vitamina A y B y minerales como el calcio, fósforo, hierro, magnesio, cobre y potasio. Además, si al chocolate se le añade leche, el aporte de calcio se incrementa notablemente. Asimismo, el ácido fólico y la tiamina (B1) que contiene el cacao como materia prima, son nutrientes indispensables para la regulación del metabolismo.<sup>3</sup>

En el presente trabajo se estudió el chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo, el cual fue elaborado a partir de granos de cacao blanco de Piura, proveniente de la provincia de Morropón. Este chocolate, de la marca Cacaosuyo, fue acreedor en el año 2015 del premio al mejor “Chocolate con Leche del Mundo” en “The International Chocolate Awards”, superando incluso a sus pares suizos.<sup>4</sup>

El objetivo de la presente investigación es determinar la composición química proximal del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo para dos lotes consecutivos; asimismo, evaluar el perfil de ácidos grasos, contenido de compuestos fenólicos, contenido de teobromina, cafeína, catequina, epicatequina y actividad antioxidante; con la finalidad de conocer su potencial nutricional y contenido de compuestos beneficiosos a la salud.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Procesamiento del cacao

#### 2.1.1 Recolección del grano del cacao

Luego de cosechar la mazorca de cacao (fruto del cacao) se pasa a recolectar “el grano baba” (grano del cacao más el mucilago), esto se realiza de una forma convencional, utilizando un material tipo “machete” con el cual se abre la mazorca y se extrae los granos en baba, los cuales son transportados a una central de beneficios, cabe mencionar que el transporte debe ser lo más pronto para evitar la fermentación no deseada.<sup>5</sup>

#### 2.1.2 Fermentación

Este paso es fundamental, ya que tiene por objetivo desprender los granos del mucílago para facilitar su conservación, provocar la muerte del embrión, prevenir la germinación y por ultimo originar las reacciones bioquímicas que dan origen a la formación los precursores del aroma y sabor. Una vez llegado los granos en baba a la central de beneficios, son llevados a una batería de fermentación.<sup>6</sup>

El proceso pasa por dos etapas una anaeróbica y otra aeróbica. Cada cajón se cubre con “Yute” (fibra de madera), desde el momento que se ha cubierto cada cajón que contiene los granos se cuenta 48 horas hasta que la fermentación llegue a 50 °C, es ahí donde se produce la **fermentación anaerobia** originada por las levaduras (*Saccharomycopsis spp*, *Kluyveromyces marxianus*, entre otros) en medio anaeróbico atacan la pulpa hidrolizando carbohidratos y proteínas para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y péptidos de bajo peso molecular. Luego de las 48 horas se realiza la primera remoción de los cajones que contienen el grano, es ahí donde se produce la **fermentación aerobia**, el objetivo de esto es ganar bacterias aeróbicas del ambiente, que son producidas principalmente por las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp* y *Pediococcus spp*) y bacterias ácido acéticas (*Acetobacter spp* y *Gluconobacter oxydans*). Estas últimas convierten el etanol en ácido acético, el cual penetra al cotiledón y causa la muerte del grano.<sup>7</sup>

### **2.1.3 Secado**

Los objetivos del secado son principalmente dos: primero disminuir la humedad de un 70 u 80% que se obtiene luego de la fermentación a un 4%, segundo es disminuir la acidez acética; la humedad es generalmente menor de 8%. El secado se puede hacer en gavetas o mallas finas extendidas y preferible de forma natural, es un secado lento que dura aproximadamente 6 días, luego se clasifica el grano según tamaño.<sup>8</sup>

## **2.2 Proceso en planta para la elaboración del chocolate**

### **2.2.1 Tostado**

Una vez terminado el secado, se realiza el proceso en planta para iniciar la elaboración del chocolate. Esta etapa tiene como objetivo activar los precursores de sabor a través de la temperatura, esta temperatura puede variar de 40 °C hasta 150 °C. El tiempo en que se realiza este proceso depende del tamaño del grano. Todo esto se realiza en un horno por convección (aire seco caliente). Las principales reacciones químicas que se producen durante este proceso son: las reacciones de Maillard, la degradación de proteínas y síntesis de compuestos azufrados (reacciones menores). Las reacciones de Maillard ocurren entre los azúcares reductores (glucosa y fructuosa) y aminoácidos libres o péptidos de cadena corta.<sup>9</sup> Mediante estas reacciones se producen componentes específicos del aroma y sabor del cacao, tales como éteres, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos, etc. Las condiciones del tostado deben ser adecuadas, ya que las elevadas temperaturas y un largo tiempo eliminan la especificidad aromática del cacao.<sup>10</sup>

### **2.2.2 Descascarado y molienda**

Esta etapa tiene como objetivo separar la cáscara del grano, este paso es importante ya que la cáscara contiene taninos, polifenoles (le da el sabor amargo al chocolate) y ocratoxinas (formadas en la fermentación). Esto se realiza en una máquina que contiene ciclón de aire, el cual se encarga de retirar la cáscara del grano; esto consiste en el quiebre del grano, dejando libres pedazos de cáscara la cual es absorbida por el ciclón de aire, dejando caer el grano libre de cáscara.<sup>5</sup>

La molienda tiene como objetivo transformar el grano de cacao libre de cáscara en pasta de licor de cacao, esto se da por fricción y calor. Esta etapa se realiza con ayuda de un molino, el cual quiebra los pedazos de cacao por fricción formándose nibs

(pedazos muy pequeños de cacao) hasta convertirse en licor (estado líquido) a una temperatura de aproximadamente 40 °C. El tamaño de partícula del licor de cacao debe ser entre 160 a 180 micras. La mayoría de estos granos tienen un 50% de manteca de cacao, es por eso que a una mayor temperatura favorece a la formación del licor de cacao, ya que los granos se derriten más rápidamente (mientras más % de manteca más rápido la formación del licor de cacao). A su vez, debido a la temperatura algunos compuestos no deseados se volatilizan, como es el caso del “ácido acético”, liberándose así acidez acética debido al calor que se produce.<sup>11</sup>

### **2.2.3 Refinado y enconchado**

El objetivo es reducir el tamaño de partícula del chocolate, que está compuesto de una mezcla de insumos que son licor de cacao, azúcar y leche; tal como se realizó en la molienda (etapa anterior). El tamaño de partícula se reduce hasta 19 o 20 micras en un tiempo de 18 a 20 horas, a la vez que el ácido acético sigue liberándose.<sup>11</sup>

El objetivo del enconchado es perfilar el sabor del chocolate producido en el tostado eliminando lo malo y conservando lo bueno. El proceso se realiza en una conchadora eliminando los malos sabores de la mezcla del chocolate líquido o licor de cacao obtenido en el refinado, a una temperatura mínima de 40 °C. La temperatura y el tiempo pueden variar según el chocolatero.<sup>12</sup>

### **2.2.4 Temperado y cristalizado**

El objetivo del temperado es alinear los cristales de grasa. Los cristales de grasa tienen una propiedad llamada “polimorfismo”, el cual hace que los cristales tengan diferentes tamaños; existen seis tipos de cristales en la manteca de cacao, el beta prima ( $\beta'$ ) es el cristal más estable por lo que no se derrite a temperaturas bajas, es por esa razón que se realiza el temperado, ya que hace que los demás cristales se comporten de la misma manera que el beta prima. Esto se realiza con un juego de temperaturas, para eliminar la formación de los cristales que aparecen cuando se derrite a bajas temperaturas, luego se deja enfriar ligeramente para manejar una temperatura que favorezca la formación de los cristales beta y lo volvemos a calentar, lo que resulta que los demás cristales se comporten de la misma forma que el beta prima, haciéndose más homogéneos y estables.<sup>13</sup>



Por otro lado, el objetivo del cristalizado es solidificar el chocolate, para esto se disminuye la temperatura a 8 °C con una humedad relativa del 80%, ocasionando un shock térmico, por lo que resulta la formación de la tableta sólida. Finalmente la tableta es empacada con un material laminado que la protege del oxígeno y humedad.<sup>13</sup>

### **2.3 Análisis Químico Proximal**

Estos análisis comprenden humedad, cenizas, grasas, proteínas, fibras totales y carbohidratos. Estos análisis son importantes para conocer el valor energético de los alimentos y así poder preparar dietas adecuadas.

La composición nutricional del cacao ha sido objeto de estudio de diversas investigaciones realizadas en los últimos años. Se han publicado datos donde se ha observado que los chocolates presentan un aporte energético superior (90-94 kcal/ración) en comparación con un cacao soluble que presenta aportes energéticos más bajos (74 kcal/ración), debido a su menor contenido graso y mayor de hidratos de carbono. En otros estudios se ha visto que los aportes de proteína de los derivados del cacao son bajos. Sin embargo, en el chocolate blanco y chocolate con leche presentan cifras superiores, debido a la presencia de sólidos lácteos en su fórmula. Hay que tener en cuenta que las proteínas del cacao no son de alto valor biológico, debido a su déficit en algunos aminoácidos esenciales. Sin embargo, en los chocolates blancos y con leche su valor aumentará por la mezcla con las proteínas lácteas de alto valor biológico.<sup>14</sup>

### **2.4 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante**

Los polifenoles son un grupo grande de sustancias químicas y heterogéneas de metabolitos secundarios biológicamente activos en plantas. Dentro de los polifenoles se encuentran los flavonoides, en este grupo de polifenoles flavonoides se encuentran las catequinas (catequina y epicatequina), más conocidas como flavonoles monoméricos, que son los principales flavonoides en el grano de cacao. La catequina y epicatequina pueden formar polímeros, que a menudo se las denominan proantocianidinas. A diferencia de las vitaminas y minerales, los polifenoles no son componentes esenciales en la dieta humana. Sin embargo, se consumen a diario debido a su ubicuidad en alimentos de origen vegetal.<sup>15</sup>

Se ha demostrado que los polifenoles desempeñan un papel importante en la conservación de la salud, debido a sus propiedades antioxidantes. Es por esta razón que los polifenoles antioxidantes contenidos en el chocolate son tan valiosos, ya que tienen la capacidad de detener la oxidación producida por los radicales libres y se sabe que estos electrones sin aparear en las células pueden desarrollar en nuestro organismo enfermedades cardíacas, Alzheimer y cáncer. Es así que, los polifenoles ayudan a disminuir el riesgo de esas y otras enfermedades interfiriendo directamente con una de las principales causas prevenibles de enfermedades crónico degenerativas. Un estudio afirmó que los polifenoles que ocurren de forma natural en el cacao, el componente principal del chocolate, en realidad aumentan los niveles de HDL, colesterol "bueno", mientras que al mismo tiempo reduce el LDL, colesterol "malo" evitando su oxidación.<sup>16</sup>

Por otro lado, la determinación de la capacidad antioxidante de diferentes productos derivados de las plantas es cada vez más el foco de interés científico. El DPPH es uno de los métodos más comunes para determinar la capacidad antioxidante *in vitro*.

## **2.5 Ácidos grasos y alcaloides**

Los principales componentes de la semilla del cacao son las grasas (24%) y los hidratos de carbono (45%). Las grasas proceden de la manteca de cacao, que contiene gran cantidad de ácido esteárico. Según investigaciones se ha demostrado que el perfil de ácidos grasos en los alimentos tiene un impacto en la salud humana. Es así que, el ácido esteárico, a pesar de ser un ácido graso saturado, tiene la propiedad de no aumentar el nivel de colesterol en la sangre. Al igual que el ácido oleico, que es un ácido graso monoinsaturado, tiene un efecto hipocolesterolémico, que a diferencias de otras grasas saturadas no tienden a aumentar las lipoproteínas de colesterol total y de baja densidad "LDL" (colesterol malo).<sup>17</sup>

El chocolate, de origen vegetal, contiene vitaminas, minerales y fitoquímicos. Curiosamente, esto se suele pasar por alto debido al estigma "poco saludable" asociado con los alimentos que contienen grasas saturadas y cafeína. En este contexto, se señala que el chocolate con leche tiene un efecto neutro sobre los niveles de colesterol. Además, el contenido de cafeína por el chocolate es insignificante en comparación con las bebidas populares como el café, té, refrescos de cola. El chocolate

con leche puede variar desde 2 a 30 mg de cafeína/50 g y el chocolate oscuro de 10 a 60 mg de cafeína/50 g.<sup>18</sup>

En la actualidad el método HPLC es utilizado comúnmente para el análisis de contenidos de cafeína y teobromina en extractos de cacao, el cual emplea la aplicación directa de los extractos sobre la columna.<sup>19</sup>

Debido a la escasa presencia de cafeína en el cacao, en el que predomina la teobromina, los efectos estimulantes sobre el sistema nervioso central del cacao y derivados son poco significativos. La teobromina es una sustancia que ejerce una acción tónica sobre el organismo, activa la diuresis y estimula la circulación sanguínea.<sup>20</sup>

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

Conocer la composición nutricional, perfil de ácidos grasos, contenido de compuestos fenólicos totales, contenido de alcaloides y actividad antioxidante de dos lotes de producción del chocolate Piura Milk – Cacaosuyo.

#### **3.2 Específicos**

Para 2 lotes consecutivos del chocolate estudiado, los objetivos específicos son:

- Determinar la composición nutricional (contenido de humedad, grasa, proteínas, fibras totales, cenizas y carbohidratos).
- Evaluar el perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos por espectrofotometría.
- Determinar el contenido de cafeína y teobromina por cromatografía HPLC.
- Determinar el contenido de catequina y epicatequina por cromatografía HPLC.
- Determinar la actividad antioxidante por el método DPPH.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Chocolate de Leche Piura Milk

#### 4.1.1 Obtención y Tratamiento de la Muestra

La muestra de cobertura de chocolate Piura Milk al 50% fue suministrada por la empresa “Cacaosuyo” codificadas como “PM-P1215SJB” y “PM-P0701SJB” (21-01-16). Para mayor facilidad, en este caso el lote “PM-P1215SJB” será llamado como “Lote 1” y el lote “PM-P0701SJB” como “Lote 2”. Estos lotes fueron escogidos, debido a su disponibilidad y el interés de la empresa que los proporcionó, ya que fueron fabricados a principios de este año y por ser este chocolate el ganador mundial en el 2015.

### 4.2 Análisis Proximal de la Muestra

Todos los métodos utilizados para los análisis proximales, fueron realizados de acuerdo al AOAC INTERNATIONAL, tal como se muestra en la referencia bibliográfica.

#### 4.2.1 Prueba de Humedad

Se realizó el análisis por triplicado de cada lote, reportándose el promedio de las tres mediciones, referido al porcentaje (100 g de muestra inicial). Se encendió el equipo de humedad de marca Sartorius Moisture Analyzer modelo MA35 y a continuación se programó de acuerdo a las siguientes condiciones: 135 °C por 6 min. Se pesó aproximadamente 2 g de muestra original de chocolate en el platillo previamente tarado con ayuda de una espátula, y se anotó el valor pesado (peso inicial). Posteriormente se anotó el peso final brindado por el equipo de humedad luego de los 6 min.<sup>21</sup>

El porcentaje de humedad de la muestra original de chocolate, fue calculado por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100$$

Donde:

P<sub>i</sub>: Peso inicial en gramos de la muestra antes de la prueba

P<sub>f</sub>: Peso final en gramos de la muestra después de la prueba

#### 4.2.2 Determinación de Cenizas

Se realizó el análisis por triplicado de cada lote, reportándose el promedio de las tres mediciones, referido al porcentaje (100 g de muestra inicial). Se pesó 1 g de muestra original de chocolate en un crisol previamente pesado. Posteriormente el crisol con la muestra fue colocado en la mufla de marca Thermo Scientific modelo No.FB1310M a una temperatura de 150 °C por 10 min, 250 °C por 20 min, 450 °C por 10 min y 625 °C por 3 horas. Al terminar se verificó que el contenido del crisol sea solo cenizas (muestra color blanca) para luego colocarlo en un desecador por unos minutos, tras lo cual se efectuó la medición de su peso.<sup>21</sup>

El porcentaje de cenizas de la muestra original de chocolate, fue calculado mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Cenizas} = \left( \frac{\text{CC} - \text{C}}{\text{Pm}} \right) \times 100$$

Donde:

CC: Peso en gramos del crisol más ceniza

C: Peso en gramos del crisol vacío

Pm: Peso en gramos de la muestra

#### 4.2.3 Determinación de Proteínas (Método de Kjeldahl)

Para la determinación de proteínas se utilizó el método Kjeldahl, el cual consta de tres etapas: Digestión, destilación y titulación. Se realizó el análisis por triplicado de cada lote, reportándose el promedio de las tres mediciones, referido al porcentaje (100 g de muestra inicial). Se utilizó un blanco.

##### Digestión

En 3 pedazos de papel aluminio de iguales dimensiones se pesó 1 g de muestra original de chocolate, los cuales fueron luego colocados en un balón de digestión. Se agregó a cada balón 4 g de una mezcla de sulfato de sodio y sulfato de cobre en proporción 9:1, y 14 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se preparó otro balón de digestión de manera similar, pero con ausencia de la muestra (blanco). Los balones de digestión fueron colocados en las hornillas del equipo digestor marca Velp Scientifica. El final de esta etapa del análisis se determinó por la aparición de una solución color

celeste en los balones con muestra, dicho color debe ser similar al de la solución con el blanco.

### **Destilación**

Para la destilación se usó matraces de 250 ml, en los cuales se colocó 40 ml de ácido bórico al 4% y 5 gotas de indicador verde de bromocresol. Luego estos matraces fueron colocados en la parte inferior del equipo de destilación marca Velp Científica, junto con cada balón de digestión rotulados con su matraz correspondiente; las condiciones para destilar fueron 40 ml de hidróxido de sodio al 50% por 5 min. Al finalizar el proceso apareció un color negro en el balón de digestión y un color verde azulado en el matraz.

### **Titulación**

La titulación fue llevada a cabo utilizando una solución valorada de ácido clorhídrico 0.054 N, la cual fue colocada en una bureta para luego titular cada uno de las soluciones en los matraces hasta el cambio de color verde a un color amarillo intenso.

Se tituló en primer lugar el blanco, cuyo color final sirvió de referencia para la titulación de las muestras. Los gastos para cada muestra y para el blanco fueron anotados para el cálculo del contenido de proteínas en las muestras.<sup>21</sup>

El porcentaje de proteína total de la muestra original de chocolate, fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteínas} = \left( \frac{14 \times (V_m - V_b) \times N \times F_p}{P_m} \right)$$

Donde:

V<sub>m</sub>: Volumen gastado en mililitros de HCl de la muestra

V<sub>b</sub>: Volumen gastado en mililitros de HCl del blanco

N: Normalidad del HCl

F<sub>p</sub>: Factor proteico 6.25

P<sub>m</sub>: Peso en gramos de la muestra

#### 4.2.4 Determinación de Grasas Totales

Para la determinación de grasas se utilizó el método de Soxhlet. Se realizó el análisis por triplicado de cada lote, reportándose el promedio de los tres resultados, expresados como porcentaje (100 g de muestra inicial). Para esta determinación, se preparó tres cartuchos de papel filtro, cuyas dimensiones fueron las más adecuadas para poder ser colocados dentro del sistema Soxhlet. Se pesó 2 g de muestra original de chocolate en cada cartucho, previamente tarado, para luego cerrar los mismos y colocar cada uno dentro de un sistema diferente.

Posteriormente se procedió a armar el sistema de Soxhlet con los balones vacíos previamente pesados y se midió 90 ml de éter petróleo en una probeta, para luego verterlos en cada uno de los balones; se cerró el sistema completamente y se colocó sobre una plancha de calentamiento por 4 horas bajo una campana de extracción. A continuación, se inició el flujo de agua por los condensadores, colocados en línea, y se prendió la plancha a temperatura media y la campana de extracción.

Al terminar el proceso se retiró cada sistema de la fuente de calor, asegurando que todo el éter de petróleo de cada sistema haya regresado al balón. Posteriormente se llevó el balón al rotavapor para concentrar el éter petróleo hasta sequedad completa, luego se dejó los balones en la estufa a 100 °C por unas horas, asegurando la eliminación total del éter de petróleo del balón y después se colocó los balones en el desecador para su enfriamiento.<sup>21</sup>

Finalmente se pesó el balón y se determinó el porcentaje de grasas totales de la muestra original de chocolate, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasas} = \left( \frac{\text{PBg} - \text{PBv}}{\text{Pm}} \right) \times 100$$

Donde:

PBg: Peso en gramos de balón con grasa

PBv: Peso en gramos del balón vacío

Pm: Peso en gramos de la muestra



#### 4.2.5 Determinación de Fibras Totales

Se pesó por triplicado cada lote, alrededor de 0.5 g de muestra desengrasada de chocolate en una balanza analítica, reportándose el promedio de las tres mediciones, referido al porcentaje (100 g de muestra inicial).

En un beaker de 250 ml se colocó 200 ml de ácido sulfúrico al 1.25% (hidrólisis ácida) y se puso a calentar con ayuda de las cocinillas hasta que esté hirviendo. Posteriormente se adicionó la muestra y se dejó hervir por 30 min, procurando que no se forme espuma; se tomó en cuenta que toda la muestra tiene que estar en contacto con la solución.

Se procedió a preparar el equipo de succión (uso de la bomba de vacío, matraz kitasato y embudo de buchner), previo a ello, se puso a calentar agua destilada (aproximadamente 500 ml) e hidróxido de sodio al 1.25% en vasos de precipitados. Terminado los 30 min, se vació inmediatamente el contenido del vaso sobre el papel filtro colocado dentro del embudo de Büchner. Se encendió la bomba de succión y se lavó el residuo con 25 ml de ácido sulfúrico al 1.25% y 3 porciones de 50 ml de agua destilada caliente.

Después del lavado, el papel filtro con la muestra se transfirió a un vaso de precipitado y se lavó usando hidróxido de sodio al 1.25% previamente calentado, hasta que se elimine todo el residuo del papel filtro. Posteriormente se dejó hervir la muestra por 30 min. Pasado los 30 min, se procedió a utilizar el equipo de succión, colocando el papel filtro (previamente pesado) en el embudo Büchner.

Se encendió la bomba de succión y se lavó el residuo con 25 ml de ácido sulfúrico al 1.25%, con 3 porciones de 50 ml de agua destilada y 25 ml de alcohol. Luego del lavado, se procedió a dejar secar el papel filtro por 2 horas a 130 °C en la estufa y luego se dejó enfriar en el desecador y se tomó el peso.<sup>21</sup>

El porcentaje de fibra total de la muestra original de chocolate, fue calculado por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \left( \frac{P_m - P}{M} \right) \times 100$$

Donde:

Pm: Peso en gramos del papel filtro con muestra

P: Peso en gramos del papel filtro

M: Peso en gramos de la muestra

#### **4.2.6 Determinación de Carbohidratos**

El porcentaje de carbohidratos se calculó por diferencia, partiendo de los 100 g de muestra y tomando en cuenta los otros componentes de la muestra como porcentajes: humedad, grasas, fibras, proteínas y cenizas. El resultado final fue reportado como porcentaje de carbohidratos.<sup>21</sup>

El porcentaje de carbohidratos de la muestra original de chocolate, fue calculado por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ carbohidratos} = 100 - (G + P + F + C)$$

Donde:

G: porcentaje de grasas totales de la muestra

P: porcentaje de proteínas totales de la muestra

F: porcentaje de fibras totales de la muestra

C: porcentaje de cenizas totales de la muestra

### 4.3 Determinación del Perfil de Ácidos Grasos

Se determinó el perfil de ácidos grasos presentes en la muestra por análisis en el cromatógrafo de gases acoplado a detector por espectrometría de masas (GC-MS). (GC: Agilent 7890A; MS: Agilent 5975 Inert XL MSD con Detector triple-Axis).

Se pesó 100 mg de grasa de chocolate de ambos lotes, obtenida por extracción con Soxhlet en un tubo centrifuga de 15 ml con tapa rosca y se agregó 10 ml de *n*-pentano, luego se añadió 100 µl de solución de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Seguidamente se cerró el tubo centrifuga y se agitó 1 min en un vórtex y se centrifugó a 3000 rpm, 4 °C, 10 min. Transcurrido el tiempo, se filtró la solución con ayuda de un filtro Phenomenex de 0.45 µm y con ayuda de una tuberculina, se recolectó el filtrado en un vial ámbar y se llevó el vial para la inyección en el GC-MS e identificación de los ácidos grasos de la muestra problema, según Frank *et al*<sup>22</sup>. Usando las siguientes condiciones de trabajo:

- Volumen de inyección: 5 µl
- Columna DB-5ms (60 m x 250 µm x 0.25 µm)
- Temperatura del horno: 100 °C por 1 min con una gradiente de temperatura de 20 °C/min hasta alcanzar 190 °C por 1 min, luego 3 °C/min hasta alcanzar 210 °C por 1 min, luego 1 °C/min hasta alcanzar 230 °C, luego 30 °C/min hasta alcanzar 300 °C.
- Split ratio: 200:1
- Tiempo de análisis: 36.5 min

### 4.4 Determinación de contenido de compuestos fenólicos

Se realizó el análisis por duplicado de cada lote, en el cual cada duplicado se realizó por triplicado, reportándose el promedio los seis resultados de cada lote, expresados como porcentaje (100 g de muestra inicial).

Se preparó primero el extracto etanólico de la muestra, pesando 0.5 g de muestra desengrasada de chocolate en tubo Falcon de 14 ml y se añadió 3 ml de etanol al 80%, luego se llevó a agitación con ayuda de un equipo de ultrasonido (marca 3510 BRANSON) por 5 min y se centrifugó a 10 °C, 5000 rpm por 10 min. Posteriormente, se

tomó el sobrenadante en una fiola de 10 ml y se enrasó con etanol al 80% (se repitió este procedimiento tres veces).

Se utilizó el para la determinación del contenido de fenólicos totales. Se tomó en un tubo de ensayo 50 µl del extracto etanólico de la muestra desengrasada y se añadió 1000 µl del reactivo Folin-Ciocalteu 10%, 1000 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5% y 970 µl de agua desionizada. Finalmente, se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Pasado el tiempo estimado se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Spectroquant® Pharo300, según Nsor *et al*<sup>23</sup>.

Para hacer la curva estándar se utilizó ácido gálico. La concentración de la solución stock del ácido gálico es 0.3 mg/ml; a partir de la cual se hicieron diferentes diluciones a concentraciones de 0, 4, 6, 7.9 y 9.9 µg/ml de ácido gálico más la adición de 1000 µl de la solución Folin-Ciocalteu al 10% y 1000 µl de carbonato de sodio al 7.5% y se completó con Agua desionizada para un volumen total de 3020 µl. Estas diluciones fueron tratadas de manera similar a la muestra, se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Pasado el tiempo estimado se leyó la absorbancia a 750 nm. El contenido de polifenoles se expresó como mg de ácido gálico en 100 g de muestra de chocolate.

#### **4.5 Determinación de contenido de cafeína y teobromina**

Este análisis se realizó por duplicado de cada lote, en el cual cada duplicado se realizó por duplicado respectivamente, reportándose en el promedio los cuatro resultados de cada lote, expresados como porcentaje (100 g de muestra inicial).

Para la determinación de Teobromina y Cafeína se pesó 0.2 g de muestra desengrasada de chocolate, se agregó 40 ml de agua desionizada y se sometió a reflujo por 30 min, luego se llevó a centrifugar a 5000 rpm, 10 min, 10 °C y se llevó a volumen en una fiola de 50 ml. Se tomó 2 ml de la solución y se pasó a través de un filtro Sep-pak C18, el cual fue previamente acondicionado con 2 ml de metanol y 5 ml de agua desionizada. Se eluyó la muestra con 10 ml de cloroformo recolectándose en un balón. Se evaporó el solvente en un rotavapor y el residuo fue disuelto con 5 ml de agua desionizada. Se inyectó 20 µl al HPLC, según Pura *et al*<sup>19</sup>. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

- Fase móvil: Agua-Acetonitrilo (8:2)
- Flujo: 1ml/min
- Columna: Purospher® STAR RP-18e (5µm)
- Temperatura: 25 °C
- Tiempo de análisis: 14 min

Para obtener la curva de calibración de teobromina se disolvió 1.5 mg de teobromina con agua desionizada en una fiola de 10 ml y a partir de esta solución stock se obtuvieron cinco diluciones a concentraciones de 1.25 a 15 µg/ml. Para la curva de calibración de cafeína se disolvió 1 mg de cafeína con agua desionizada en una fiola de 10 ml y se realizaron cinco diluciones en un rango de concentraciones de 0.5 a 4 µg/ml.

#### **4.6 Determinación de contenido de catequina y epicatequina**

Este análisis se realizó por duplicado de cada lote, en el cual cada duplicado se realizó por triplicado respectivamente, reportándose en el promedio los seis resultados de cada lote, expresados como porcentaje (100 g de muestra inicial).

Para la determinación de Catequina y Epicatequina se pesó 0.5 g de muestra desengrasada de chocolate en un tubo Falcon de 14 ml y se agregó 5 ml de etanol al 80%, luego se colocó en el equipo de ultrasonido por 15 min, seguidamente se centrifugó a 10 °C, 5000 rpm, 10 min y se enrasó con etanol al 80%. Finalmente se filtró la solución con ayuda de un filtro Phenomenex de 0.45 µm y se inyectó 10 µl al HPLC, según Deñe *et al*<sup>18</sup>. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

- Fase móvil: Acetonitrilo-Ácido acético 2.5 %
- Flujo: 1ml/min
- Columna: LiChroCART® 250-4, Superspher® 100 RP-18e
- Temperatura: 35 °C
- Tiempo de análisis: 30 min

Para obtener la curva de calibración de catequina se disolvió 1 mg de catequina con etanol al 80% en una fiola de 5 ml y a partir de esta solución stock se obtuvieron cinco diluciones a concentraciones de 10 a 50 µg/ml. Para la curva de calibración de epicatequina se disolvió 1 mg de epicatequina con etanol al 80% en una fiola de 5 ml y se realizaron cinco diluciones a una concentración de 40 a 120 µg/ml.

## 4.7 Determinación de la actividad antioxidante

### 4.7.1 Test de DPPH

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó el test de DPPH. Se realizó el análisis por triplicado para cada lote pesando 0.5 g de muestra desengrasada de chocolate (muestra en polvo) en tubos Falcon y se enrasó con etanol al 80%. En la primera extracción se añadió 3 ml de etanol al 80%, sometiéndolo al ultrasonido por 10 min, luego se llevó al vórtex por 1 min y finalmente se centrifugó por 10 min a 5000 rpm a 10 °C. La extracción se repitió 3 veces por cada muestra desengrasada tomando todo el sobrenadante luego de la centrifugación de cada extracción pasando todo el contenido del sobrenadante a una fiola de 10 ml y se enrasó con etanol al 80%.

A partir de esta solución se determinó la actividad antioxidante, realizando diferentes diluciones en tubos de ensayo a concentraciones de 0.063 a 0.625 mg/ml de la muestra más la adición de 3950 µl de DPPH y se completó con etanol al 80% para un volumen total de 4000 µl a las 6 diluciones. Se colocaron los tubos de ensayo en la oscuridad por 30 min. Se pesó 1.97 mg de DPPH en una fiola de 50 ml y se enrasó con etanol al 80% para preparar un control de DPPH. La reducción de DPPH de cada tubo fue determinada a 517 nm en un espectrofotómetro de marca Spectroquant® Pharo300 frente a un blanco de etanol al 80% después del tiempo de incubación de 30 min.

Como control positivo se utilizó ácido ascórbico. La concentración stock de ácido ascórbico fue de 0.7 mg/ml; en las cuales se hicieron diferentes diluciones teniendo concentraciones de 0.002, 0.004, 0.005, 0.007 y 0.009 mg/ml de ácido ascórbico. Estas diluciones fueron tratadas de manera similar a la muestra, según Othman *et al*<sup>24</sup>.

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ AA} = \left( 1 - \left( \frac{\text{Am}}{\text{Ac}} \right) \right) \times 100$$

Donde:

AA: actividad antioxidante

Am: absorbancia de la muestra

Ac: absorbancia control DPPH

La concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) de la actividad antioxidante se obtiene mediante la curva de calibración del porcentaje de la actividad antioxidante versus la concentración de la muestra (mg/ml).

#### **4.8 Análisis Estadístico**

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las diferentes variables de ambos lotes, se utilizó la comparación de medias, según la Prueba T para muestras relacionadas, empleando el software IBM SPSS Statistics Versión 19.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Análisis proximal de las muestras

En la tabla 1 se observan los resultados del análisis proximal de ambos lotes, a partir de la muestra original del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo, expresado como peso en gramos por 100 g de muestra inicial, obtenidos del promedio de los resultados de cada ensayo por triplicado. Los resultados se muestran en porcentaje  $\pm$  la DE (desviación estándar) respectiva.

**Tabla 1.** Análisis proximal del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo

<b>Componente</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>
<b>% Grasa</b>	42.2 $\pm$ 0.26	39.5 $\pm$ 0.20
<b>% Fibra</b>	1.5 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.02
<b>% Proteína</b>	9.8 $\pm$ 0.19	9.8 $\pm$ 0.12
<b>% Cenizas</b>	2.1 $\pm$ 0.03	2.3 $\pm$ 0.01
<b>% Carbohidratos</b>	44.4 $\pm$ 0.43	46.9 $\pm$ 0.15
<b>% Humedad</b>	3.9 $\pm$ 0.03	3.9 $\pm$ 0.03

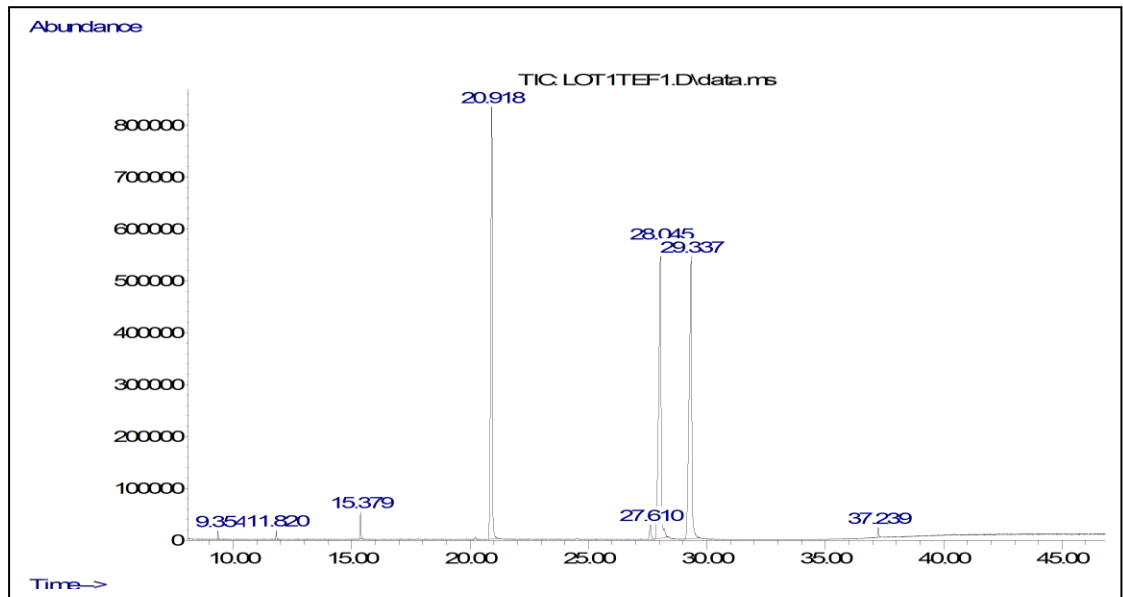
Solo para los análisis de grasa, cenizas y carbohidratos hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes ( $p < 0.05$ ).



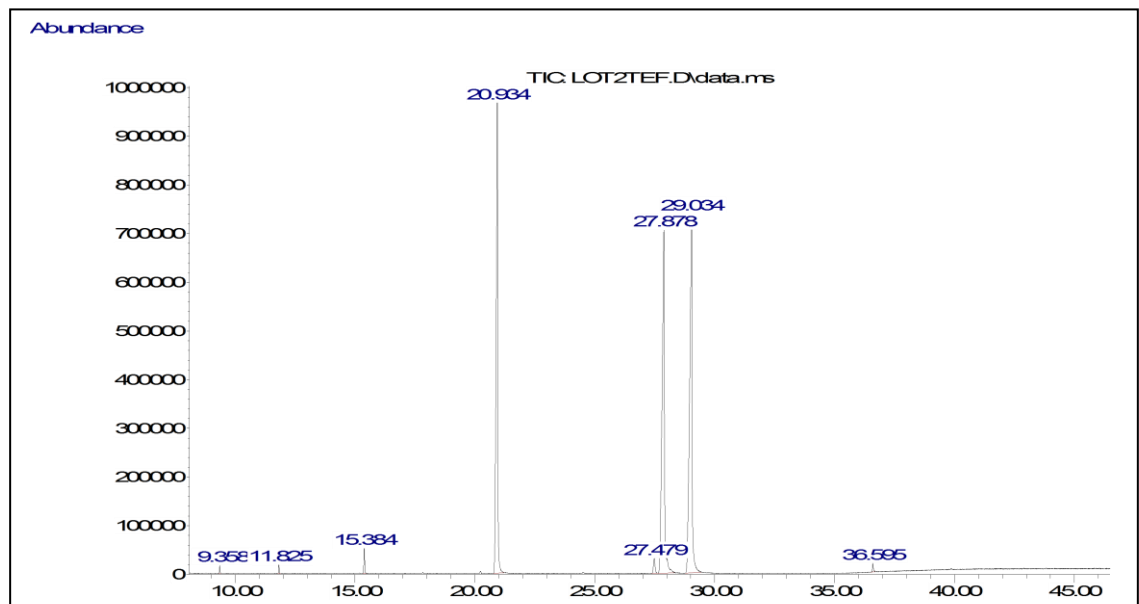
## 5.2 Perfil de Ácidos Grasos

Los análisis por GC-MS provenientes de la muestra desengrasada del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo de ambos lotes dieron como resultado los siguientes cromatogramas que se observa en la Figura 1.

- **Lote 1**



- **Lote 2**



Cromatogramas de gases del perfil de ácidos grasos del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo

Los ácidos grasos mayoritarios para ambos lotes del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo son ácido esteárico (33.6%), ácido oleico (32.5%) y ácido palmítico (30.9%) tal como se muestra en la Tabla 2.

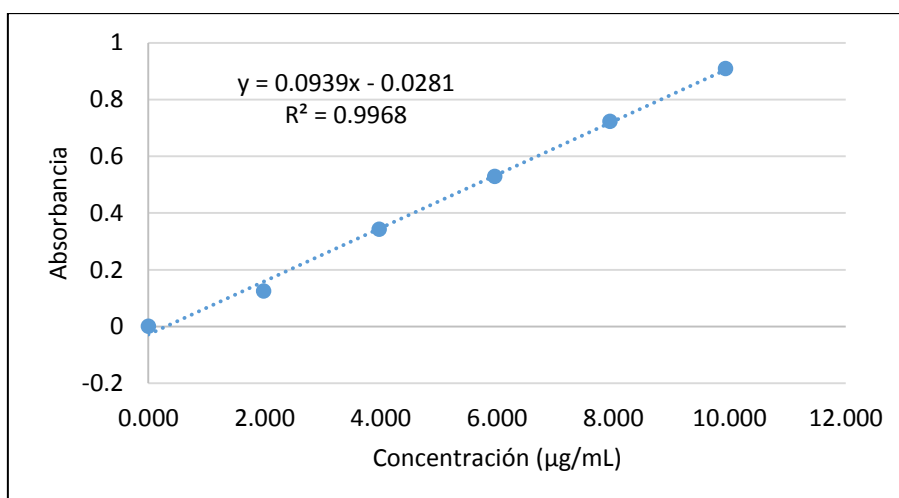
**Tabla 2.** Perfil de ácidos grasos del chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo

Ácido graso	Lote 1		Lote 2	
	t <sub>R</sub> (min)	% Área relativa	t <sub>R</sub> (min)	% Área relativa
Ácido cáprico (10:0)	9.4	0.2	9.4	0.2
Ácido laúrico (12:0)	11.8	0.3	11.8	0.2
Ácido mirístico (14:0)	15.4	1.0	15.4	0.8
Ácido palmítico (16:0)	20.9	30.9	20.9	30.3
Ácido linoleico (18:2) ( $\Delta^{9,12}$ )	27.6	1.1	27.5	1.0
Ácido oleico (18:1) ( $\Delta^9$ )	28.0	32.5	27.9	32.5
Ácido esteárico (18:0)	29.3	33.6	29.0	34.8

Solo hubo diferencias estadísticamente significativas en el contenido de ácido mirístico entre ambos lotes ( $p < 0.05$ ).

### 5.3 Contenido de Compuestos Fenólicos

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos se utilizó el extracto etanólico de la muestra desengrasada del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo. El contenido de fenólicos fue calculado con ayuda de la curva de calibración de ácido gálico mostrada en la Figura 2.



**Figura 2.** Curva estándar de ácido gálico

En la tabla 3 se muestran los contenidos de compuestos fenólicos para ambos lotes expresados en miligramos de ácido gálico por cada 100 g de muestra de chocolate, destacando el valor obtenido para el lote 2 en comparación del lote 1.

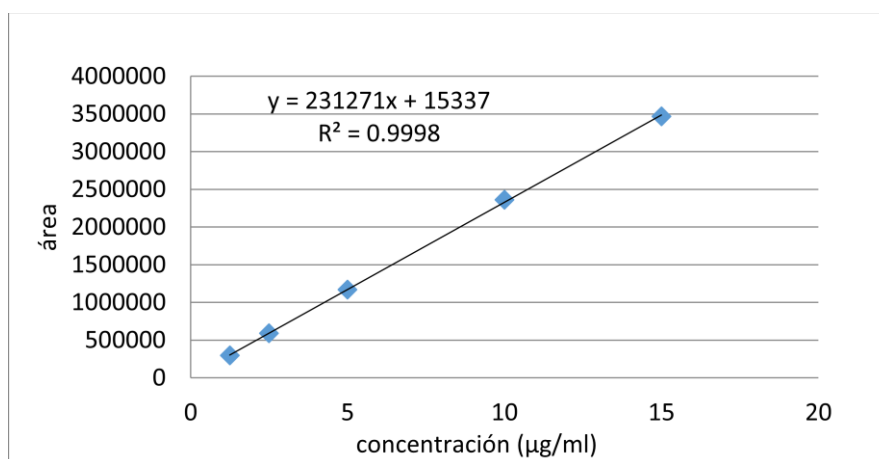
**Tabla 3.** Contenido de compuestos fenólicos totales en el chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo

Contenido de compuestos fenólicos totales (mg AG/100 g chocolate)	
Lote 1	Lote 2
370.76 ± 3.63	396.65 ± 1.46

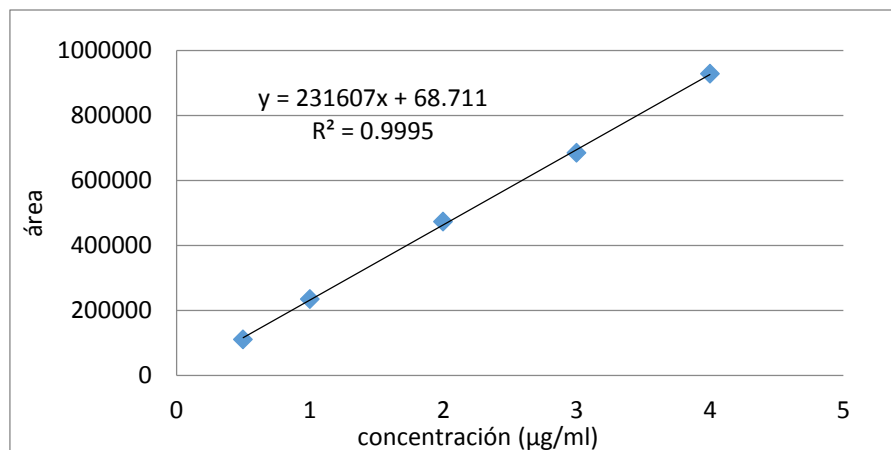
Para esta prueba hubieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes ( $p < 0.05$ ).

#### 5.4 Contenido de teobromina y cafeína

Los contenidos de Teobromina y Cafeína del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo fueron determinados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para tal efecto primero se elaboraron curvas de calibración de teobromina y cafeína, las cuales se presentan en las figuras 3 y 4, respectivamente.



**Figura 3.** Curva de calibración de teobromina



**Figura 4.** Curva calibración de cafeína

En la tabla 4 se muestran los contenidos de teobromina y cafeína para ambos lotes expresados en mg de teobromina y cafeína por cada 100 g de muestra de chocolate, destacando el contenido de teobromina sobre cafeína. Además, la relación que existe de teobromina a cafeína para el lote 1 es 4.04 y para el lote 2 es 5.05.

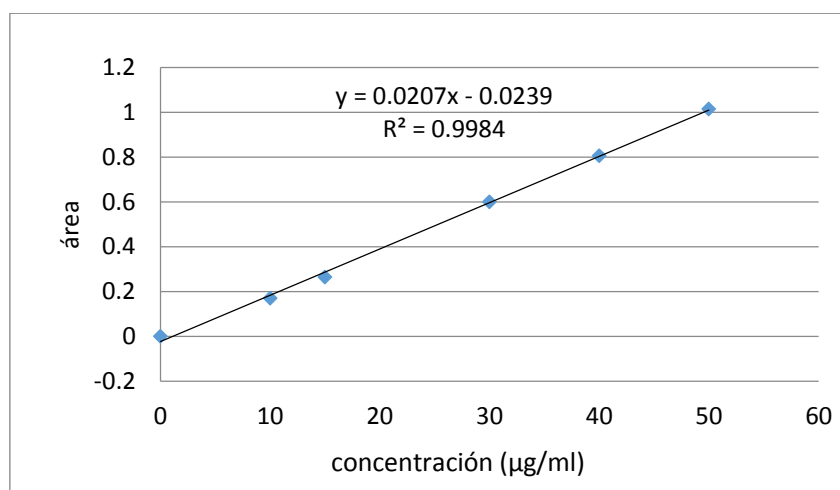
**Tabla 4.** Contenido de teobromina y cafeína en el chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo

Muestra	Contenido de teobromina y cafeína (mg/100 g chocolate)	
	Teobromina	Cafeína
<b>Lote 1</b>	287.06 ± 2.20	70.97 ± 1.32
<b>Lote 2</b>	231.76 ± 0.67	45.86 ± 0.88

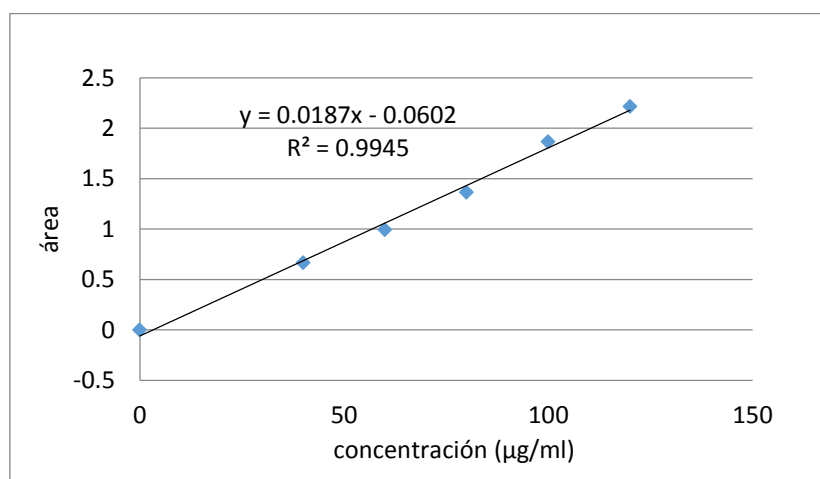
Para esta prueba hubieron diferencias estadísticamente significativas en ambos lotes ( $p < 0.05$ ).

## 5.5 Contenido de catequina y epicatequina

Los contenidos de Catequina y Epicatequina del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo fueron determinados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para tal efecto primero se elaboraron curvas de calibración de catequina y epicatequina, las cuales se presentan en las figuras 5 y 6, respectivamente.



**Figura 5.** Curva de calibración de catequina



**Figura 6.** Curva de calibración de epicatequina

En la tabla 5 se muestran los contenidos de catequina y epicatequina para ambos lotes expresados en mg de catequina y epicatequina por cada 100 g de muestra de chocolate, destacando el contenido de epicatequina sobre catequina. Así mismo, la

relación que existe de epicatequina a catequina para el lote 1 es 4.95 y para el lote 2 es 4.92.

**Tabla 5.** Contenido de catequina y epicatequina en el chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de catequina y epicatequina (mg/100 g chocolate)</b>	
	<b>Catequina</b>	<b>Epicatequina</b>
<b>Lote 1</b>	20.50 ± 0.19	101.48 ± 0.46
<b>Lote 2</b>	18.38 ± 0.15	90.47 ± 0.29

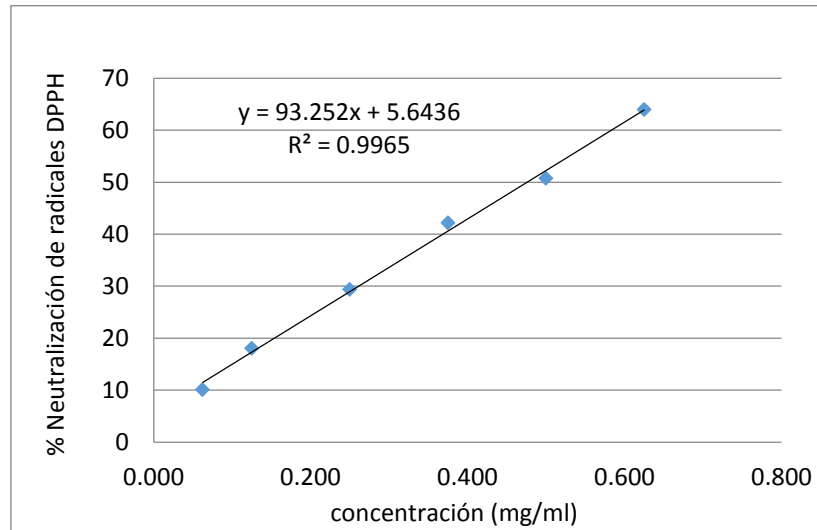
Para esta prueba hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes en el contenido de epicatequina y catequina ( $p < 0.05$ ).

## 5.6 Actividad antioxidante

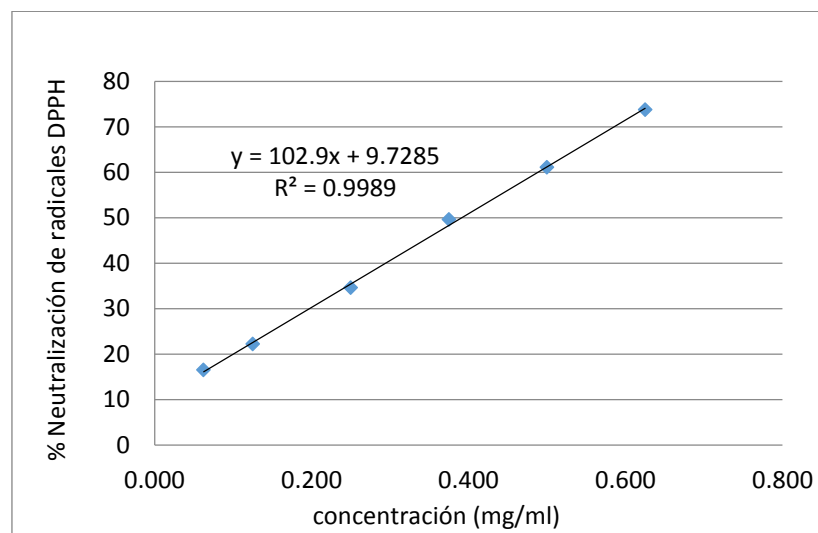
### 5.6.1 Test de DPPH

En la figura 7 se muestra la curva de actividad antioxidante en el test DPPH de ambos lotes para el chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo.

- **Lote 1**

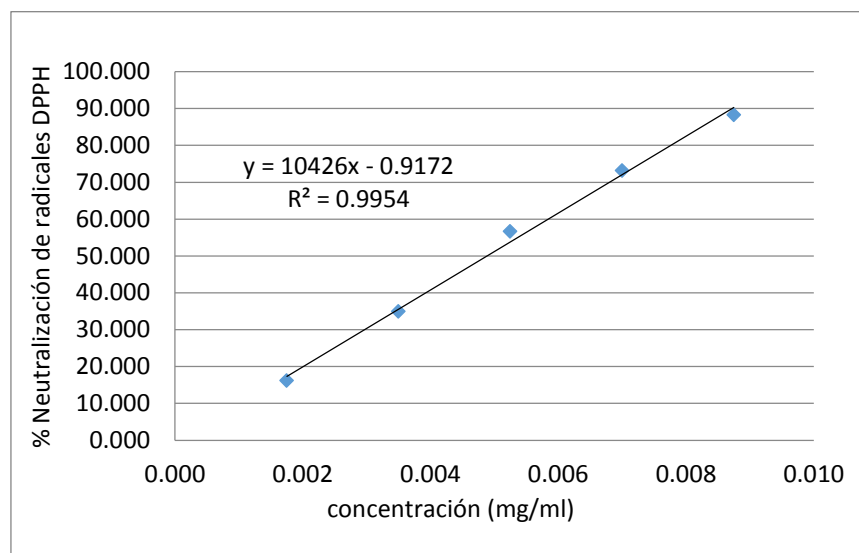


- **Lote 2**



**Figura 7.** Curvas de % Neutralización de radicales DPPH vs concentración del chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo

Las concentraciones efectivas medias ( $EC_{50}$ ) en el test de DPPH para los lotes 1 y 2 fueron 0.476 y 0.391 mg/ml, respectivamente. Por otro lado, la  $EC_{50}$  para el control positivo ácido ascórbico fue 0.005 mg/ml. La curva de calibración de ácido ascórbico se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Curva de calibración de ácido ascórbico

Para la prueba de actividad antioxidante realizada por el método DPPH existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes ( $p < 0.05$ ).



## VI. DISCUSIÓN

En la formulación del chocolate, los ingredientes clave son: sólidos de cacao, manteca de cacao, azúcar y lecitina como emulsionante; que están dispersos en una fase continua que se compone sobre todo de la manteca de cacao. El grano del cacao contiene químicamente diferentes componentes como agua, fibra, proteína, azúcares, polifenoles, alcaloides, etc.

En el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo se encontró principalmente carbohidratos; lo cual fue corroborado por un estudio que se realizó a chocolates y a granos de cacao de Ghana y Ecuador. En el cacao, la grasa era el principal nutriente mientras que en los chocolates eran los carbohidratos. Asimismo, en el estudio que se realizó al chocolate se obtuvo porcentajes de humedad (>2%), cenizas (2%), fibra (<2%), proteínas (>7%), grasa (>30%) y carbohidratos (>40%)<sup>25</sup>, similares al obtenido en chocolate de leche Piura Milk, ya que en el lote 1 y lote 2 se obtuvo humedad (3.9, 3.9%), cenizas (2.1, 2.3%), fibra (1.5, 1.5%), proteínas (9.8, 9.8%), grasa (42.2, 39.5%) y carbohidratos (44.4, 46.9%) respectivamente. Tanto para el cacao y el chocolate las diferencias en el contenido de grasa y carbohidratos se deben principalmente por un efecto de procedencia geográfica y/o variedad del cacao.

Los ácidos grasos que presentaron mayor proporción en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo para el lote 1 y lote 2 fueron ácido esteárico (33.6, 34.8%), oleico (32.5%) y palmítico (30.9, 30.3%) respectivamente; los cuales al ser comparados con un estudio realizado a los chocolates más consumidos en Turquía, se observó solo pequeñas diferencias en el contenido de ácido esteárico (39.0%), oleico (26.0%) y palmítico (25.6%).<sup>26</sup> Otro estudio realizado a chocolates de diferente origen geográfico (Ecuador y Ghana) nos da también como mayor contenido al ácido esteárico (35 - 38%), oleico (33 - 32%) y palmítico (28 - 27%) respectivamente.<sup>25</sup> Esto nos indica que la procedencia geográfica puede ser importante para el contenido del perfil de ácido graso.

Para la determinación de compuestos fenólicos se utilizó el reactivo Folin - Ciocalteu (F-C), el cual mide la capacidad que tienen los polifenoles para reducir o donar un electrón, presente en el complejo molibdotungstato que está presente en el reactivo de F-C; como resultado de tal reducción, el reactivo que es de color amarillo adquiere un intenso color azul, el cual es cuantificado en el espectrofotómetro.

El contenido de compuestos fenólicos totales en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo, para ambos lotes fue 370.76 y 396.65 mg AG/100 g. Estos contenidos fueron menores a lo encontrado por Todorovic *et al*<sup>15</sup> en un chocolate oscuro (1042 mg AG/100 g), lo que indica que la leche puede interferir en el análisis de polifenoles debido a las proteínas de la leche.

Por otro lado, se ha hecho estudios por HPLC a productos de licor de cacao, cacao en polvo y chocolate para analizar los polifenoles y se ha visto que la cantidad de polifenoles es similar en estos productos. Sin embargo, esta investigación sirvió para distinguir cada tipo de polifenoles en base a su tamaño molecular. Además, se observó que al igual que en el chocolate Piura Milk, la leche también interfería en estos productos, esto puede deberse a que las proteínas de la leche y de los polifenoles pueden unirse interfiriendo en el contenido de compuestos fenólicos. Más estudios deben hacerse al respecto ya que casi todos los productos de cacao disponibles en el mercado contienen leche.<sup>18</sup>

De los diversos compuestos de cacao, la teobromina y la cafeína parecen ser los más importantes para ejercer alguna actividad psico-farmacológica; se han realizado ensayos en humanos que demuestran que estos alcaloides afectan el rendimiento cognitivo y el estado de ánimo, sintiéndose la persona en un mayor estado de alerta. Además de los efectos psico-farmacológicos, estos alcaloides, particularmente la teobromina y en un grado menor la cafeína, pueden tener un papel en la reducción de glucosa en plasma.<sup>15</sup>

El contenido de teobromina y cafeína fue determinado por HPLC, este análisis se basa en la identificación y cuantificación de estos alcaloides mediante un solvente orgánico que es el cloroformo, se utilizó este compuesto como medio de extracción ya que la cafeína es un derivado orgánico que se disuelve muy bien en un medio de naturaleza orgánica. Asimismo, se utilizó el cartucho Sep-pak 18, debido a que los pigmentos de interferencia del chocolate se eliminan eficazmente al pasar el extracto acuoso a través de este cartucho, para luego ser inyectado en la columna de fase inversa, empleando acetonitrilo y agua como fase móvil, ya que reduce el tiempo de análisis sin afectar la resolución del pico o la exactitud de la cafeína y teobromina.<sup>19</sup>

El contenido de teobromina (287.06 y 231.76 mg/100 g) y de cafeína (70.97 y 45.86 mg/100 g) en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo fueron superiores los reportados en un

estudio realizado en Reino Unido a muestras de chocolates comerciales (teobromina: 5 a 137 mg/100 g; cafeína: 5 a 31 mg/100 g chocolate).<sup>27</sup> Asimismo, otro estudio realizado en Francia a un chocolate reportó 118 mg/100 g para teobromina y 11 mg/100 g para cafeína.<sup>28</sup>

Los estudios realizados a los chocolates en Reino Unido y Francia, se determinaron también por HPLC, utilizando el mismo método que el chocolate Piura Milk - Cacaosuyo, por lo que se puede inferir que las diferencias en el contenido de teobromina y cafeína no fue afectado por el método realizado, sino más bien varía dependiendo del origen geográfico, principalmente de la altitud de los cultivos, del porcentaje y/o tipo de cacao con que se elaboró cada chocolate; cabe resaltar que estos alcaloides son responsables del sabor amargo en el chocolate.

El contenido de catequina y epicatequina fue determinado por HPLC. Este análisis se basa en la identificación y cuantificación, mediante la extracción con un solvente orgánico (etanol). Se utilizó este disolvente ya que en investigaciones anteriores se observó que tuvo una buena eficacia para extractos de cacao y chocolate. En el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo, los contenidos de catequina (20.50 y 18.38 mg/100 g) y de epicatequina (101.48 y 90.47 mg/100 g) fueron mayores a los de los chocolates oscuros procedentes de Japón y Serbia (catequina: 3.2 - 18.3 mg/100 g; epicatequina: 12.4 y 26.3 mg/100 g).<sup>15, 19</sup>

Este estudio comparativo entre los chocolates de Japón y Serbia, se determinó también por HPLC, utilizando el mismo solvente para su extracción, es por eso que los resultados superiores en el chocolate Piura Milk - Cacaosuyo puede deberse por un efecto de la procedencia geográfica, el cual es un factor importante para el contenido de estos compuestos. Además, algunos estudios han reportado que el contenido de catequina + epicatequina puede disminuir de 5 a 10 veces su valor con respecto al polvo de cacao, lo cual entonces va a depender del tipo de procesamiento para la elaboración del chocolate.<sup>18</sup>

Se utilizó el método DPPH para evaluar la actividad antioxidante del chocolate de leche Piura Milk – Cacaosuyo, ya que el test DPPH es uno de los ensayos colorimétricos utilizados en la actualidad para la determinación de la actividad antioxidante de muestras de diversa naturaleza. En este se usa el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), el cual es estable y presenta una coloración violeta que absorbe radiación a una longitud de onda de 517 nm. La disminución de radicales DPPH se refleja en el cambio de color violeta a amarillo.

Para la determinación de la actividad antioxidante del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo, se observó que el lote 1 tuvo una  $EC_{50} = 0.476$  mg/ml, presentando una menor actividad antioxidante que el lote 2 ( $EC_{50} = 0.391$  mg/ml). Estas actividades antioxidantes son similares a las reportadas en un estudio para un chocolate oscuro ( $EC_{50} = 0.40$  mg/ml), aunque mejores para un chocolate de leche ( $EC_{50} = 1.20$  mg/ml).<sup>29</sup> Este estudio comparativo entre los chocolates, se determinó también a través del test de DPPH, igual que en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo, por lo que se puede inferir que las diferencias entre las concentraciones efectivas medias no se debe por el método realizado, sino del origen geográfico, porcentaje y/o tipo de cacao con que se elaboró cada chocolate.

El análisis estadístico realizado para los estudios realizados en ambos lotes del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo, mostró diferencias estadísticamente significativas para los resultados de catequinas, alcaloides, fenólicos y actividad antioxidante. Las diferencias encontradas entre lotes para la mayoría de estos parámetros fue menor al 15%, en términos prácticos de producción, estas diferencias podrían ser no muy importantes. Las diferencias observadas entre los lotes podrían deberse a variaciones en la materia prima, el proceso poscosecha y el procesamiento de elaboración de chocolate. Para el caso de teobromina y cafeína, la diferencia entre los lotes fue de 19% y 35% respectivamente. Dado que el contenido de estos alcaloides dependen principalmente del tipo y origen del cacao y no tanto del proceso poscosecha, se recomienda realizar análisis de estos alcaloides en la materia prima (grano de cacao) antes de iniciar la elaboración de chocolate.

A partir de los resultados obtenidos y según lo reportado en la bibliografía, se puede establecer que el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo comparado con otros chocolates tiene una buena actividad antioxidante. Asimismo, el contenido de catequinas, teobromina, cafeína y los ácidos grasos mayoritarios encontrados son relevantes; estos compuestos son importantes en nuestro organismo, por lo que contribuyen de forma positiva para la salud, como ya se ha mencionado. El presente estudio contribuye a la caracterización química y la determinación de propiedades antioxidantes de dicho chocolate, que espero que pueda servir para su valorización y el desarrollo de futuras investigaciones.

## VII. CONCLUSIONES

- El chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo (Lotes 1 y 2), contiene principalmente carbohidratos (44.4, 46.9%), seguido de grasa (42.2, 39.5%), proteína (9.8, 9.8%), humedad (3.9, 3.9%), cenizas (2.1, 2.3%) y fibra (1.5, 1.5%).
- Los ácidos grasos más representativos en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo para los lotes 1 y 2 son el esteárico (33.6, 34.8%), oleico (32.5, 32.5%) y palmítico (30.9, 30.3%).
- El contenido de compuestos fenólicos en los lotes 1 y 2 fue  $370.76 \pm 3.63$  y  $396.65 \pm 1.46$  mg AG/100 g, respectivamente.
- El contenido de teobromina y cafeína en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo fue 287.06 y 70.97 mg/100 g para el lote 1; 231.76 y 45.86 mg/100 g para el lote 2.
- El contenido de catequina y epicatequina en el chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo fue 20.50 y 101.48 mg/100 g para el lote 1; 18.38 y 90.47 mg/100 g chocolate para el lote 2.
- Las concentraciones efectivas medias ( $EC_{50}$ ) para la actividad antioxidante (test de DPPH) del chocolate de leche Piura Milk - Cacaosuyo para los lote 1 y 2 fueron 0.476 y 0.391 mg/ml, respectivamente.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **MINISTERIO DE AGRICULTURA. SENASA.** Resumen informativo del 03 de octubre del 2012. Disponible en: [www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/jer/NOTICIAS/Microsoft%20Word%20-%20RESUMEN%20INFORMATIVO%2003OCT2012.pdf](http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/jer/NOTICIAS/Microsoft%20Word%20-%20RESUMEN%20INFORMATIVO%2003OCT2012.pdf)
2. **OHENE AFOAKWA E** (2010) *Chocolate Science and Technology. University of Ghana.* 1ra edición. Pp. 91.
3. **DING EL, HUTFLESS SM, DING X, GIROTRA S.** (2006). Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrition Metabolism (Lond).* **3**: 2.
4. **SUGOBONO N.** (2015). *DULCE PASIÓN. Revista SOMOS.* 12va edición. Pp. 28-30.
5. **BECKETT TS.** (2000). *The Science of Chocolate. Royal Society of Chemistry.* Cambridge, UK. Capítulo 2. Pp. 11-13.
6. **PORTILLO E, LABARCA M, GRAZZIANI L, CROS E, ASSEMAT S, DAVRIEUX F, BOULANGER R, MARCANO M.** (2009). Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista UDO Agrícola.* **9(2)**: 458-468.
7. **HANSEN CE, DEL OLMO M, SCHMITZ HH.** (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agr.* **77**: 237-281.
8. **NOGALES J, GRAZZIANI DE FARIÑAS N, ORTIZ DE BERTORELLI L.** (2006). Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera. *Agronomía Trop.* **56(1)**: 5-20.
9. **FRAUENDORFER F, SCHIEBERLE P** (2008). Changes in Key Aroma Compounds of Criollo Cocoa Beans During Roasting. *J Agric Food Chem.* **56**: 10244–10251.
10. **OWUSU M, PETERSEN MA, HEIMDAL H.** (2013). Relationship of sensory and instrumental aroma measurements of dark chocolate as influenced by fermentation method, roasting and conching conditions. *J Food Sci Technol.* **50**: 909.
11. **BECKETT ST.** (1994). Control of particle size reduction during chocolate grinding. *The Manufacturing Confectioner.* **74(5)**: 90-97.
12. **BORDIN SCHUMACHER A, BRANDELLI A, WULF SCHUMACHER E, CARRION MACEDO F, PIETA L, VENZKE KLUG T, VOGT DE JONG E.** (2009). Development and evaluation of a laboratory scale conch for chocolate production. *International J Food Sci Technol.* **44**: 616-622.
13. **OHENE AFOAKWA E, PATERSON A, FOWLER M, VIEIRA J.** (2008). Effects of tempering and fat crystallisation behaviour on microstructure, mechanical properties and appearance in dark chocolate systems. *J Food Eng.* **89**: 128–136.

14. **KRIS-ETHERTON PM, MUSTAD VA.** (1994). Chocolate feeding studies: a novel approach for evaluating the plasma lipid effects of stearic acid. *Am J Clin Nutr.* **60(6)**: 1029-1036.
15. **TODOROVIC V, RADOJCIC I, TODOROVIC Z, JANKOVIC G, DODEVSKA M, SOBAJIC S.** (2015). Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *J Food Comp Anal.* **41**: 137-143.
16. **BEARDEN MM, PEARSON DA, REIN D, CHEVAUX KA, CARPENTER DR, KEEN CL, SCHMITZ H.** (2000). Potential Cardiovascular Health Benefits of Procyanidins Present in Chocolate and Cocoa. *Am Chem Soc.* **754(19)**: 177-186.
17. **NANCY SALINAS, WIRMER BOLIVAR** (2012) Ácidos grasos en chocolates venezolanos y sus análogos. *An Venez Nutr.* **25(1)**: 34-41.
18. **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. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64(12)**: 2581-2587.
19. **PURA NAIK J.** (2001). Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. *J Agric Food Chem.* **49**: 3579-3583.
20. **RAFECAS M, CODONY R.** (2000). Estudio Nutricional del Cacao y Productos Derivados. *Universitat de Barcelona.* Pp. 12.
21. **A.O.A.C INTERNATIONAL.** (2010). Official methods of Analysis of AOAC International. 18th edition. 3 revisions. Gaithersburg, MD, USA, *Association of Analytical Communities.* Capítulo 31, Pp. 1-17.
22. **FRANK D, PAT S, ALLEN V.** (2005). Agilent Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies.*
23. **NSOR-ATINDANA J, ZHONG FANG, MOTHIBE KJ, BANGOURA ML, LAGNIKA C.** (2012). Quantification of Total Polyphenolic Content and Antimicrobial Activity of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells. *Pakistan J Nutr.* **11 (7)**: 574-579.
24. **OTHMAN A, AMIN I, NAWALYAH A, GHANI A, ADENAN I.** (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* **100**: 1523-1530.
25. **TORRES-MORENO M, TORRESCASANA E, SALAS-SALVADÓ J, BLANCH C.** (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chem.* **166**: 125-132.
26. **P G ERGÖNÜL, B ERGÖNÜL, A K SEÇKIN** (2009) Cholesterol content and fatty acid profile of chocolates mostly consumed in Turkey. *CyTA - Journal of Food.* **8 (1)**: 73-78.
27. **ALAÑÓN M E, CASTLE S M, SISWANTO P J, CIFUENTES-GÓMEZ T, SPENCER J P E** (2016) Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. *Food Chemistry.* **208**: 177-184.

28. **ABEL CARLIN-SINCLAIR, IMAN MARC LAURENCE MENGU, DAMIEN PRIM** (2009) The Determination of Methylxanthines in Chocolate and Cocoa by Different Separation Techniques: HPLC, Instrumental TLC, and MECC. *The Journal of Chemical Education*. **86**: 1307-1310
29. **PEREA-VILLAMIL J, CADENA-CALA T, HERRERA-ARDILA J** (2009) El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos-CICTA-, Sede UIS*. **41**.