

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**  
**“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”**



**PERFIL QUÍMICO-NUTRICIONAL Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**  
**DEL CHOCOLATE “VALLE DEL CHANKA”**

Sara Ines Hinostroza Eslava

Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico

Lima-Perú

2017

## **ASESORA**

Rosario Elena Rojas Durán MD, PhD

## **MIEMBROS DEL JURADO**

**Presidente:** Q.F. Patricia León Paredes

**Vocal:** Dr. José Aliaga Arauco

**Secretario:** Blga. Luz M. Pacheco Lechuga

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a Dios y a mi abuelito Germán Eslava Ramírez por ser mi fuerza y guía en lo largo de toda mi carrera profesional.

Le doy gracias a mis padres Víctor Hinojosa Ramírez y Zoraida Eslava Flores por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una buena educación en el transcurso de mi vida.

A mi amiga y hermana Katy Pumacayo Apaza por los 5 años de experiencia universitaria que compartimos. Gracias por tu amistad pura, sincera e incondicional.

A Luis Antonio Blas Pérez por darme muchos ánimos y apoyo constante desde que comencé este gran reto profesional.

Un especial agradecimiento a la Dra. Rosario Rojas por haberme brindado la oportunidad de desarrollar mi tesis en su laboratorio, así como brindarme su asesoría y conocimientos para la culminación de mi trabajo de investigación. Su apoyo, confianza y paciencia me ayudan a crecer profesionalmente.

A MSc. Candy Ruiz, MSc. David Condori, MSc. Fabio Espichan y PhD. Kirti Patel por haberme tenido la paciencia necesaria y por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación. Sin sus conocimientos y experiencias brindadas no hubiera podido concluir mi trabajo de investigación.

Finalmente quiero agradecer a la empresa Amazona Chocolate, por brindarme las muestras de chocolate para el desarrollo de mi tesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura N°1: Cromatograma de gases del perfil de ácidos grasos del lote1407004.....	37
Figura N° 2: Cromatograma de gases del perfil de ácidos grasos del lote 1506001.....	37
Figura N° 3: Curva de calibración de ácido gálico.....	38
Figura N° 4: Curva de calibración de catequina.....	39
Figura N° 5: Curva de calibración de epicatequina.....	39
Figura N° 6: Cromatograma HPLC de catequina y epicatequina del lote 1407004.....	40
Figura N° 7: Cromatograma HPLC de catequina y epicatequina del lote 1506001.....	40
Figura N° 8: Curva de concentración versus porcentaje de actividad antioxidante del ácido ascórbico.....	42
Figura N° 9: Curva de concentración versus porcentaje de actividad antioxidante del extracto etanólico del lote 1407004.....	42
Figura N° 10: Curva de concentración versus porcentaje de actividad antioxidante del extracto etanólico del lote1506001.....	43
Figura N° 11: Curvas de caída de la intensidad de fluorescencia en el tiempo.....	44

Figura N° 12: Curva de calibración de trolox.....	45
Figura N° 13: Curva de calibración de teobromina.....	46
Figura N° 14: Curva de calibración de cafeína .....	46
Figura N° 15: Cromatograma de teobromina y cafeína en el lote 1407004.....	47
Figura N° 16: Cromatograma de teobromina y cafeína en el lote 1506001.....	47
Figura N° 17: Cromatograma de gases de los compuestos volátiles del lote 1407004.....	49
Figura N° 18: Cromatograma de gases de los compuestos volátiles del lote 1506001.....	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla N°1: Análisis proximal del chocolate “Valle del Chanka”.....	36
Tabla N° 2: Perfil de ácidos grasos del chocolate “Valle del Chanka”.....	38
Tabla N° 3: Contenido de polifenoles totales, catequina y epicatequina en ambos lotes del chocolate “Valle del Chanka”.....	41
Tabla N° 4: Concentraciones efectivas medias de las muestras de chocolate y el ácido ascórbico.....	43
Tabla N° 5: Actividad antioxidante de los extractos de dos lotes del chocolate “Valle del Chanka”.....	45
Tabla N° 6: Contenido de metilxantinas en dos lotes del chocolate “Valle del Chanka” .....	48
Tabla N° 7: Perfil de ácidos grasos de dos lotes del chocolate “Valle del Chanka” .....	50

## ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
min	Minuto
%	Porcentaje
mg/g	Miligramo por gramo
Tn	Tonelada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
HS	Espacio de cabeza
SPME	Micro-extracción en Fase Sólida
GC/MS	Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
NIST 08	National Institute of Standards and Technology
SPE	Extracción en fase sólida
TE	Teobromina
CA	Cafeína
TE/CA	Relación entre teobromina y cafeína
PT	Polifenoles totales
AGE	Ácido gálico equivalente
FT	Flavonoides totales
CAT	Catequina
ECAT	Epicatequina
AA	Actividad antioxidante
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (1,1- difenil-2-picrilhidrazilo)
EC <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
AAPH	2,2-azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro

## ÍNDICE

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1. Procedencia del chocolate.....	14
2.1.1. Cacao.....	14
2.1.2. Taxonomía del cacao.....	15
2.2. Propiedades del chocolate.....	15
2.3. Producción y comercio del chocolate.....	17
2.4. Proceso de elaboración del chocolate.....	18
III. OBJETIVOS.....	21
3.1. General.....	21
3.2. Específicos.....	21
IV. METODOLOGÍA.....	22
4.1. Obtención de la muestras.....	22
4.2. Tratamiento de la muestras.....	22
4.3. Materiales y reactivos.....	22
4.3.1. Equipos y materiales de laboratorio.....	22
4.3.2. Reactivos.....	23
4.4. Análisis proximal.....	24
4.4.1. Prueba de humedad.....	24
4.4.2. Determinación de cenizas.....	24
4.4.3. Determinación de proteínas (Método de Kjeldahl).....	25
4.4.4. Determinación de grasas totales.....	26
4.4.5. Determinación de fibra total.....	27
4.4.6. Determinación del porcentaje de carbohidratos.....	28
4.5. Determinación del perfil de ácidos grasos.....	28
4.6. Determinación de polifenoles totales.....	29

4.7.	Determinación de catequina y epicatequina.....	30
4.8.	Actividad antioxidante.....	31
4.8.1.	Test de DPPH.....	31
4.8.2.	Test de ORAC.....	32
4.9.	Determinación de metilxantinas (teobromina y cafeína).....	34
4.10.	Determinación del perfil de compuestos volátiles.....	35
4.11.	Análisis Estadístico.....	35
V.	RESULTADOS.....	36
5.1.	Composición proximal de las muestras.....	36
5.2.	Perfil de ácidos grasos.....	37
5.3.	Contenido de polifenoles totales, catequina y epicatequina...38	
5.4.	Actividad antioxidante.....	41
5.4.1.	Test de DPPH.....	41
5.4.2.	Test de ORAC.....	44
5.5.	Contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína).....	45
5.6.	Perfil de compuestos volátiles.....	48
VI.	DISCUSIÓN.....	51
VII.	CONCLUSIONES.....	56
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## RESUMEN

En nuestro país hay una gran diversidad de empresas dedicadas a la elaboración de chocolates a partir de cacao de origen peruano, una de ellas es la empresa Amazona Chocolate. Es la primera empresa peruana ganadora de la etapa semifinal del International Chocolate Awards en el año 2013 y ganadora de dos medallas de bronce, gracias a sus chocolates Shunte 74% y Valle del Chanka 72%, en el Academy of Chocolate en el año 2015 en la ciudad de Londres.

Este estudio tiene como objetivo analizar dos lotes de producción consecutivos del chocolate "Valle del Chanka" al 72% y conocer su potencial nutricional y actividad antioxidante. Los lotes analizados se producen dos veces por año a partir de cacaos nativos de la Cooperativa Oro Verde ubicados en Lamas, región de San Martín.

El análisis químico proximal del chocolate "Valle del Chanka" dio como resultado un alto contenido de grasa (53.2 - 53.6%) y carbohidratos (34.8 - 35.1%).

El perfil de ácidos grasos, determinado por cromatografía de gases, está constituido principalmente por ácidos grasos saturados como el esteárico (39.8%) y palmítico (23.9 - 24.4%) e insaturados como el oleico (33.5% - 34.0%).

El contenido de compuestos fenólicos totales, determinado por espectrofotometría fue de 678.5 - 794.0 mg EAG/100 g chocolate.

El contenido de epicatequina (23.9 - 26.4 mg/100 g), determinado por cromatografía HPLC, fue mayor que el contenido de catequina (1.6 - 2.2 mg/100 g).

La actividad antioxidante, determinada por el test de DPPH y expresada como  $EC_{50}$  (Concentración efectiva media para neutralizar radicales DPPH), fue 0.2 - 0.3 mg/mL. Mientras que en el test de ORAC fue 668.5 - 978.4  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/g chocolate.

El contenido de teobromina (521.3 - 526.9 mg/100 g), determinada por cromatografía HPLC, fue mayor que el de cafeína (136.2 - 148.7 mg/100 g).

Finalmente, en el análisis por GC-MS (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) se detectaron 29 compuestos volátiles. Los compuestos mayoritarios fueron 3, 6-dimetilpirazina (40.5 - 40.9%) y el ácido acético (30.5 - 30.9%).

## ABSTRACT

In our country there are several companies engaged in the manufacture of chocolates from cocoa of Peruvian origin, one of them is Amazona Chocolate. It is the first Peruvian company that won the semifinal of the International Chocolate Awards in the year of 2013 and is the winner of two bronze medals, thanks to their chocolates "Shunte" 74% and "Valle del Chanka" 72%, at the Academy of Chocolate held in London in 2015.

The aim of this study was to analyze two consecutive production batches of "Valle del Chanka" chocolate (72%) in order to know their nutritional potential and antioxidant activity.

The proximate chemical analysis of "Valle del Chanka" chocolate showed high content of fat (53.2 - 53.6%) and carbohydrates (34.8 - 35.1%).

The fatty acid profile, determined by gas chromatography, showed mainly saturated fatty acids, such as stearic (39.8%) and palmitic (23.9 - 24.4%) acids; as well as unsaturated ones like oleic acid (33.5% - 34.0%).

The content of total phenolic compounds, determined by spectrophotometric method, was 678.5 - 794.0 mg EAG/100 g chocolate.

The content of epicatechin (23.9 - 26.4 mg/100 g), determined by HPLC chromatography, was higher than the content of catechin (1.6 - 2.2 mg/100 g).

The antioxidant activity, determined by the DPPH test, was expressed as EC<sub>50</sub> (Medium effective concentration needed to neutralize DPPH radicals): 0.2 - 0.3 mg/mL, while in the ORAC test was 668.5 - 978.4 μmol Trolox equivalents/g chocolate.

The content of theobromine (521.3 - 526.9 mg/100 g), determined by HPLC chromatography, was higher than the one of caffeine (136.2 - 148.7 mg/100 g).

Finally, the GC-MS analysis (Gas chromatography-mass spectrometry) detected 29 volatile compounds. The major ones were 3,6-dimethylpyrazine (40.5 - 40.9%) and acetic acid (30.5 - 30.9%).

## I. INTRODUCCIÓN

El chocolate se caracteriza por ser un alimento con alta densidad energética y fuente de compuestos fitoquímicos con potenciales efectos favorables a la salud. Este alimento proviene de la semilla del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.), que es una especie originaria de los bosques tropicales húmedos de América del sur, en el área del alto Amazonas, que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil.<sup>1, 2.</sup> Esta es la única de las 22 especies de plantas tropicales pertenecientes al género *Theobroma* que ha sido estudiada con mayor profundidad por sus fines comerciales y beneficios que aporta a la salud.<sup>3</sup>

El mercado mundial clasifica los granos de cacao en dos categorías: cacao “fino y de aroma” y cacao “mayor u ordinario”. Los primeros son granos producidos a partir de árboles de cacaos criollos y trinitarios que representan el 4% de la producción mundial y constituyen un ingrediente valioso ya sea solo o formando parte de las mezclas con cacaos ordinarios, debido a que producen características específicas de sabor, aroma y color en chocolates negros, gourmet y otras especialidades. Por otro lado, el cacao ordinario es utilizado como materia prima básica para el procesamiento de licor, polvo y manteca de cacao requeridos en la fabricación de una amplia gama de confitería masiva con sabor a chocolate y de gran demanda en la industria farmacéutica y cosmética.<sup>4, 5.</sup>

El Perú produce 78 mil toneladas de cacao anuales en 100 mil hectáreas. Las regiones de la Selva como Ucayali, San Martín, la selva de Puno, Pasco, Junín, Satipo, Huánuco, Cusco, Cajamarca, Ayacucho, Amazonas, Madre de Dios, y Loreto producen 76,657 toneladas, es decir concentran el 98% del total. El 72% de dicha producción es cacao criollo o fino.<sup>6</sup>

El 60% de las variedades de cacao que existen en el mundo se encuentran en el Perú, por tal motivo es considerado uno de los principales lugares de origen del cacao.<sup>7</sup> Cabe destacar también que nuestro país es el segundo productor mundial de cacao fino y de aroma (luego de Ecuador), por tal motivo debemos explotar esta ventaja absoluta con la que contamos, para no ser solamente proveedores de materia prima, sino también, fabricantes de productos terminados de calidad como el chocolate.

Asimismo, se debe promover el consumo habitual en nuestra dieta de cacao y sus derivados, como el chocolate, ya que presentan una importante fuente de polifenoles en particular los flavonoides que comprenden estructuras monoméricas como (+)-catequina y (-)-epicatequina, con gran actividad antioxidante que previenen enfermedades cardio y cerebrovasculares.<sup>8</sup> También en su composición encontramos a las metilxantinas (teobromina, cafeína), las cuales han sido asociadas con efectos estimulantes del sistema nervioso y beneficiosos a nivel gastrointestinal, respiratorio y renal.<sup>9</sup> Asimismo, son utilizadas como parámetro de calidad que permite diferenciar entre un cacao fino y un cacao ordinario.<sup>10</sup>

Los chocolates contienen ácidos grasos saturados e insaturados (principalmente palmítico, esteárico y oleico) que pueden modificar la composición de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y hacerla resistente al daño oxidativo.<sup>11</sup> Además presenta compuestos volátiles que le brindan el aroma y sabor característico. Estos compuestos varían de acuerdo al genotipo del cacao, condiciones climáticas, proceso de fermentado, secado, tostado y conchado.<sup>12</sup>

Perú ha logrado exportar el 36% del cacao fino y de aroma que se produce a nivel mundial a mercados internacionales de Europa Occidental (Alemania, Suiza, Bélgica) y Estados Unidos para la elaboración principalmente de chocolates finos.<sup>13</sup>

Por otro lado, existen empresas peruanas que aprovechan las variedades de cacao con que contamos para elaborar chocolates; este es el caso de Amazona Chocolate, una empresa que se dedica al desarrollo de chocolatería fina en el Perú, empleando cacaos de origen. Fue la primera empresa peruana que ganó la etapa semifinal de la ronda de EE.UU, América y el Pacífico del International Chocolate Awards en el 2013 y ganadores de dos medallas de bronce gracias a sus chocolates Shunte 74% y Valle del Chanka 72% en el Academy of Chocolate en el año 2015 en la ciudad de Londres.<sup>14,15</sup>

La investigación del chocolate peruano es importante y necesaria ya que actualmente no existen muchos estudios que muestren todo su potencial químico-nutricional. En tal sentido, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la composición químico-nutricional, perfil de ácidos grasos, contenido de polifenoles totales, contenido de catequina y epicatequina, actividad antioxidante, contenido de cafeína y teobromina; así como el perfil de compuestos volátiles de dos lotes consecutivos de producción del chocolate “Valle del Chanka” 72% y comprobar la reproducibilidad de las características nutricionales y químicas del producto.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Procedencia del chocolate

#### 2.1.1. Cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L) es un árbol de 4 a 8 metros de altura, que puede alcanzar los 10 metros de alto si crece con buena sombra; sus frutos pueden tener forma elipsoidal, ovoide, fusiforme, oblonga o esférica de acuerdo a su genética y zona geográfica; contienen de 30 a 40 semillas cubiertas de una pulpa blanca dulce y comestible.<sup>16</sup>

Los tipos de cacao se clasifican tradicionalmente en tres grupos genéticos: Criollo, Forastero y Trinitario. El cacao criollo ha sido cultivado desde hace mucho tiempo en Centroamérica y Sudamérica. Este grupo está compuesto por variedades que producen semillas de color blanco, se considera que tiene gran calidad, por lo cual se reserva para los chocolates más finos y exquisitos. Sin embargo, el árbol que lo produce es de escaso rendimiento y muy frágil, por lo cual el cacao Criollo sólo llega a representar el 10% de la producción mundial. Las variedades del grupo Forastero son ampliamente cultivadas debido a sus altos rendimientos y resistencia a las enfermedades. Este grupo se subdivide en Forasteros de Bajo y Alto Amazónico. Los granos son aplanados, pequeños de color morado y sabor amargo. Los Trinitarios se consideran híbridos, se originó a partir del cruzamiento entre criollos y forasteros amazónicos en la isla de Trinidad. De este cruce se presentan una diversidad de formas de mazorca, de coloración, pudiéndose hallar tonos verdes y rojizos e inclusive una mezcla de ambos; el color interno del cotiledón es morado. Este grupo se usa como material de injerto para multiplicarlo sin perder sus características, las mejores cruza combinan el sabor del cacao criollo con la rusticidad del Forastero, produciendo cacao de mucha demanda por su aplicación en los chocolates de alto grado de “sabor”.<sup>17, 18.</sup>

## 2.1.2. Taxonomía del cacao

*Theobroma cacao* L. es el nombre científico que recibe el árbol del cacao o cacaotero. “Theobroma” significa en griego «alimento de los dioses». La clasificación taxonómica del cacao es:<sup>19</sup>

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Dicotiledónea
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Malvales
Familia:	Malvaceae
Subfamilia:	Sterculioideae
Género:	Theobroma
Especie:	<i>Theobroma cacao</i> L.

## 2.2. Propiedades del chocolate

El chocolate, es un alimento que contiene compuestos biológicamente activos como:

- Ácidos Grasos:

Uno de los ingredientes necesarios para la elaboración de chocolates es la manteca de cacao que contiene predominantemente triglicéridos de ácidos grasos saturados (esteárico, palmítico) e insaturados (oleico).<sup>20</sup>

Más del 73% de los glicéridos están presentes como formas monoinsaturadas. El ácido esteárico es un ácido graso saturado conocido como “no aterógeno” ya que no aumenta el nivel de colesterol en la sangre; propiedad que también contribuye a la mejora de la salud cardiovascular de las personas que consumen de manera frecuente el cacao y sus derivados.<sup>21</sup> Estudios clínicos han demostrado que el ácido esteárico tiene efectos neutros en la lipoproteína de baja densidad (LDL) debido a que el hígado lo convierte rápidamente en ácido oleico.

Es así que existe la probabilidad de que ciertos ácidos grasos puedan modificar la composición de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y hacerlo resistente al daño oxidativo.<sup>11</sup>

Los ácidos grasos se pueden determinar por análisis de Cromatografía de gases acoplado a detector por espectrometría de masas (GC-MS).<sup>22</sup>

- Compuestos fenólicos:

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad. Dentro de este grupo se encuentran los flavonoides cuyo subgrupo de interés son los flavanoles monoméricos (catequina y epicatequina) que se encuentran en mayor cantidad en los granos de cacao y derivados. Estudios demuestran que los flavonoides, en particular los flavanoles monoméricos, tienen propiedades antioxidantes que contribuyen a inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo cual provoca un aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Este aumento es considerado como uno de los factores que ayuda a proteger el organismo de sufrir enfermedades cardio y cerebrovasculares.<sup>23, 24</sup>

Así mismo, existen estudios *in vitro* que demuestran que los flavonoides actúan como moduladores de la actividad de algunas enzimas como citocromo P450, óxido nítrico sintetasa, ciclooxigenasa y las lipooxigenasas, además de proteger al ADN del daño oxidativo es por ello que se le atribuye la acción de vasodilatador, antihemorrágico, antiinflamatorio y antineoplásico.<sup>25</sup>

Los métodos más utilizados para el estudio de los compuestos fenólicos y su actividad en los chocolates son: Folin-Ciocalteu, utilizado para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales cuyo instrumento de medición es el espectrofotómetro UV-VIS; la cuantificación de los flavanoles monoméricos (catequina y epicatequina) que se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) por su alta reproducibilidad; y el Test de DPPH y ORAC que son métodos *in vitro* que determinan la capacidad antioxidante del chocolate utilizando el Espectrofotómetro UV-VIS y Fluorómetro como instrumentos de medición, respectivamente.

- Metilxantinas

Son un grupo de moléculas orgánicas pertenecientes a la familia de los alcaloides conformados por teofilina, cafeína y teobromina; estas dos últimas se encuentran en el cacao y sus derivados. Un estudio clínico doble ciego contra placebo midió los efectos de las metilxantinas presentes en 50 g de chocolate oscuro dando como resultado un incremento del estado de alerta, vitalidad y mejor estado de ánimo en los sujetos tratados. Esto se da debido a que estos alcaloides tienen efectos estimulantes sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), siendo antagonistas de los receptores de adenosina.<sup>9, 26</sup>

Por otro lado, la relación teobromina/cafeína es utilizada como parámetro de calidad que permite diferenciar entre un cacao fino y un cacao ordinario.<sup>10</sup>

La técnica más utilizada para cuantificar estos alcaloides es la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) ya que se caracteriza por ser rápida y reproducible en muestras de chocolate.<sup>27</sup>

- Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles son aquellos que brindan el aroma y sabor característico de los chocolates. Estos compuestos varían de acuerdo al genotipo del cacao, condiciones climáticas, proceso de fermentado, secado, tostado y conchado.<sup>28</sup>

Los grupos aldehídos, pirazinas, ácidos, alcoholes, ésteres, cetonas, furanos, pirroles y terpenos son algunos de los compuestos volátiles detectados e identificados utilizando la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).<sup>29</sup> Estudios indican que algunos aldehídos, pirazinas y el ácido acético se han revelado como compuestos clave del aroma y el sabor final a chocolate. Asimismo, muestran que las pirazinas podrían ser usadas para diferenciar los orígenes de cacao.<sup>10, 12.</sup>

### 2.3. Producción y comercio del chocolate

Los principales países productores de chocolate son Alemania, Suiza, Bélgica y Estados Unidos, dentro de los cuales Europa Occidental representa el 35% de la producción mundial de chocolate y Estados Unidos el 28%.<sup>30</sup>

En el 2011, el 32% de todas las ventas de chocolate se llevaron a cabo en Europa Occidental. Suiza tuvo el mayor consumo de chocolate (12 kg al año por persona) que cualquier otro país.<sup>31</sup>

El tipo de chocolate que más se consume es el de leche aunque la demanda por el chocolate oscuro se está incrementando significativamente. Israel hoy en día tiene el 50% de su consumo en chocolate negro. Esta tendencia también se está observando en China y Japón. Puede que el chocolate aún no esté creciendo en volumen de consumo per cápita, pero claramente países asiáticos tan importantes como los mencionados anteriormente están migrando hacia chocolates de mejor calidad. En nuestro país existen pocas empresas dedicadas a la producción de chocolate a pesar de poseer el 60% de las variedades de cacao a nivel mundial y ser el segundo productor de cacao fino de aroma después de Ecuador. Este contexto muestra todas las oportunidades que el Perú tiene como productor mundial.<sup>7, 8.</sup>

#### 2.4. Proceso de elaboración del chocolate

El chocolate se consigue a partir de los granos de cacao, para ello se tiene que seguir los siguientes procesos:<sup>32,33.</sup>

- Aceptación y limpieza: En esta operación se busca garantizar que las especificaciones de calidad de la materia prima (granos de cacao) cumplan con la exigencia de la industria procesadora de chocolate, antes de ser aceptadas para su procesamiento. Los granos de cacao que superan las pruebas son seleccionadas y, casi inmediatamente transformadas o por el contrario se almacenan para un uso posterior. Asimismo se busca eliminar los cuerpos extraños como: metales, piedras, trozos de madera, vidrios, entre otros. Luego de esta operación es posible que aún queden residuos los cuales se eliminan posteriormente en forma manual.
- Descascarillado: Es el proceso en el que se elimina la cáscara que es la cubierta exterior de la semilla del cacao. Indiferentemente de los distintos fines que se persigan con los granos del cacao en la industria, todos deben someterse primero a un proceso de descascarillado antes de que se transformen en pasta o licor de cacao.

Existen dos tipos de procesos para realizar el descascarillado:

- La primera opción es realizar un tostado previo del grano junto con su cáscara a bajas temperaturas y luego se procede con la eliminación de esta última.
- La segunda opción es realizar un pre-tratamiento térmico que utiliza la tecnología de infrarrojos en el que los granos se someten a la radiación infrarroja en un lecho fluidizado o transportador vibratorio. El agua se

acumula en la superficie del grano de la cáscara y genera explosiones o rupturas y desprendimiento de la cáscara. La temperatura alta de la superficie inducida por este proceso provoca una disminución en la cantidad de contaminación microbiológica, particularmente de levaduras y hongos. Los granos se separan de las cáscaras y los granos se tostan. Este último proceso se considera más adecuado para el procesamiento de grandes volúmenes de cacao debido a su alta rentabilidad.

- **Tostado:** Es la operación esencial donde primariamente a partir del contenido de humedad natural, en combinación con el calentamiento se promueve un conjunto de reacciones químicas en las cuales intervienen los compuestos precursores formados durante la fermentación y el secado que luego darán origen al sabor y aroma inicial del chocolate. Sin embargo el buen sabor y aroma depende mucho de la variedad de cacao y de cómo se realizó el proceso de fermentación y secado. Las condiciones de tostado son de 15 a 30 minutos a una temperatura de 100 - 130 °C. Las condiciones del tostado deben ser adecuadas, ya que las elevadas temperaturas y un largo tiempo eliminan la especificidad aromática del cacao.
- **Alcalinización:** Las semillas de cacao experimentan un proceso denominado alcalinización, generalmente con carbonato de potasio, que se destina a aumentar la intensidad del sabor y el color del producto final. Esta operación se puede aplicar en diferentes niveles del proceso de transformación de la semilla de cacao.
- **Molienda y prensado:** El cacao tostado y limpio se muele mediante rodillos de acero para producir licor de cacao que pasa luego por prensas, es en esta etapa cuando se separa la manteca de la masa o licor de cacao hasta el porcentaje deseado, y el residuo que se forma durante este proceso es lo que constituye la torta de cacao que se pulveriza para preparar polvo de cacao el cual tiene un uso muy amplio en la industria alimentaria.
- **Refinado:** El licor de cacao es usado para producir el chocolate a través de la adición de manteca de cacao. Otros ingredientes tales como azúcar, leche, agentes emulsificantes y productos equivalentes a la manteca de cacao también son añadidos y mezclados. Dependiendo del tipo de chocolate a producir, variará la proporción de los diferentes ingredientes. La mezcla es sometida a un proceso de refinamiento, mediante su paso por una serie de

rodillos hasta que se forme una pasta suave. El refinado mejora la textura del chocolate.

- Conchado y templado: La mezcla refinada se lleva a un proceso de amasado o de suavizado, cuya función es desarrollar aún más la intensidad del sabor y la textura del chocolate. Luego esta es temperada o pasada a través de un proceso de calentamiento, enfriamiento y recalentamiento. Esto previene el decoloramiento del producto y la migración de grasas hacia su superficie.
- Moldeado y empaquetado: La mezcla es colocada en moldes o usada para cubrir los productos rellenos y enfriada en un cuarto (o cámara) de enfriamiento y finalmente el chocolate es empacado para la distribución a los clientes.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

Conocer el perfil químico-nutricional, compuestos volátiles y actividad antioxidante de 2 lotes de producción del chocolate “Valle del Chanka” 72% (Amazona Chocolate).

#### **3.2. Específicos**

Para los 2 lotes de producción de chocolate “Valle del Chanka”:

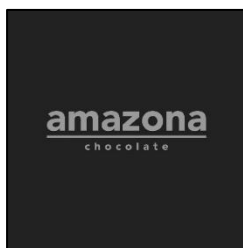
- Determinar la composición química-proximal.
- Determinar el perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases.
- Evaluar el contenido de polifenoles totales por método espectrofotométrico.
- Evaluar el contenido de catequina y epicatequina por cromatografía HPLC.
- Evaluar la actividad antioxidante por los métodos de DPPH y ORAC.
- Determinar el contenido de cafeína y teobromina por cromatografía HPLC.
- Determinar el perfil de compuestos volátiles por cromatografía de gases

## IV. METODOLOGIA

### 4.1. Obtención de las muestras

Se analizaron 2 lotes de producción consecutivos del chocolate “Valle del Chanka” al 72% de cacao, cuya fabricación se realiza dos veces por año.

Las muestras fueron proporcionadas por la empresa Amazona Chocolate y se presentan a continuación:



<u>Lotes de producción</u>	<u>Fecha de producción</u>	<u>Fecha de vencimiento</u>
1407004	26 julio 2014	24 junio 2015
1506001	25 julio 2015	23 junio 2016

Los lotes analizados fueron producidos a partir de cacaos nativos de la Cooperativa Oro Verde ubicados en Lamas, región de San Martín.

### 4.2. Tratamiento de las muestras

Se pesó 100 g de chocolate de ambos lotes, los cuales fueron sometidos a baño maría a 50 °C por unos minutos y con agitación constante para lograr una correcta homogenización de las muestras. Finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente durante todo el día para luego proceder a realizar los análisis correspondientes.<sup>34</sup>

### 4.3. Materiales y Reactivos

#### 4.3.1. Equipos y materiales de laboratorio

- ✓ Balanza analítica (OHAUS, adventurer)
- ✓ Estufa eléctrica con ventilación forzada (Venticell)

- ✓ Rotavapor (Büchi, modelo Rotavapor II)
- ✓ Vortex (Vortex IKA – MS3 Basic)
- ✓ Centrifuga eléctrica (Hettich – Universal 320R)
- ✓ Rapidvap (Labconco, 7900003)
- ✓ Ultrasonido (Branson, 3510)
- ✓ Espectrofotómetro Visible (ThermoSpectronic, Genesys 20)
- ✓ Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (Agilent Technologies 7890A; Agilent Technologies 5975C)
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (Hitachi, Elite LaChrom L-4555, L-2130) con un detector UV-VIS (DAD)
- ✓ Equipo Soxhlet
- ✓ Cartucho Sep-pak C18 (Chromabond)
- ✓ Silica gel LiChroprep RP-18 (40-63 µm; Merck)
- ✓ Filtro jeringa de 0.45 µm de tamaño de poro (Phenomenex, Phenex PTFE 15 mm)
- ✓ Tubo de centrifugación (Falcon 25 mL)
- ✓ Fibras SPME (Solid Phase Microextraction)
- ✓ Lector de fluorescencia (Hidex Chamaleon)

#### 4.3.2. Reactivos

- ✓ Éter de petróleo ACS (35 - 60 °C; J.T. Baker)
- ✓ Hidróxido de sodio PA (Fermont)
- ✓ Hidróxido de potasio PA (Fermont)
- ✓ Agua ultrapura (Tipo 1)
- ✓ Cloroformo HPLC (J.T. Baker)
- ✓ Metanol HPCL (J.T. Baker)
- ✓ Acetonitrilo HPLC (TEDIA)
- ✓ Ácido acético glacial ACS (Fermont)
- ✓ Nitrito de sodio ACS (Merck)
- ✓ Cafeína referencia (Sigma, MO, USA)
- ✓ Teobromina 99% (Sigma, MO, USA)
- ✓ Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma, MO, USA)
- ✓ Carbonato de sodio anhidro ACS (J.T. Baker )
- ✓ Ácido gálico (Sigma, MO, USA)
- ✓ (+)-Catequina hidratada HPLC (Sigma, MO, USA)
- ✓ Etanol HPLC (J.T. Baker)

- ✓ (-)-Epicatequina HPLC (Sigma, MO, USA)
- ✓ DPPH (Sigma, MO, US)
- ✓ L- ácido ascórbico (Sigma, MO, USA)

#### 4.4. Análisis proximal

##### 4.4.1. Prueba de humedad

Se pesó 1 g de muestra para determinar la humedad, para ello se colocó la muestra en la estufa a 100 °C hasta que el peso sea constante.<sup>35</sup> El análisis fue realizado para dos lotes de un chocolate por triplicado y se reportó el promedio del peso perdido (humedad) como porcentaje (por 100 g de muestra).

El porcentaje de humedad fue calculado con la siguiente fórmula:

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

Donde:

$P_i$  = Peso inicial en gramos de la muestra

$P_f$  = Peso final en gramos de la muestra

##### 4.4.2. Determinación de cenizas

Se pesó 1 g de muestra en un crisol previamente pesado, para luego exponerla a la llama hasta calcinación completa. Posteriormente, el crisol con la muestra calcinada fue colocada en una mufla a 600 °C durante 8 h, asegurándose que la temperatura sea constante durante dicho tiempo.<sup>36</sup> Luego de verificar que el contenido del crisol sea solo cenizas, este fue colocado en un desecador durante 15 min para finalmente ser pesado en la balanza analítica. Los análisis fueron realizados por triplicado, reportándose los resultados como porcentaje,

El porcentaje de cenizas fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = 100 \times \left( \frac{AB - A}{M} \right)$$

Donde:

*AB*: Peso en gramos del crisol más la ceniza.

*A*: Peso en gramos del crisol vacío.

*M*: Peso en gramos de la muestra

#### 4.4.3. Determinación de proteínas (Método de Kjeldahl)

El proceso de determinación de proteínas consta de 3 etapas: Digestión, destilación y titulación. El análisis fue realizado por triplicado y el resultado reportado es el promedio de los triplicados, expresados en porcentaje.

##### a) Digestión:

Se pesó 1 g de chocolate y se colocó en balones de digestión, de los cuales uno fue destinado para el blanco. Se agregó a cada balón de digestión 4 g de una mezcla de sulfato de cobre y sulfato de sodio (1:9) y 14 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se procedió a agitar los balones de digestión para luego ser colocados en las hornillas del equipo digestor a una temperatura moderada. La etapa final se da por la aparición de una solución color celeste en los balones con la muestra los cuales tienen que asemejarse al blanco. Luego se deja en ebullición los balones por unos minutos más y finalmente se apaga el equipo digestor y se deja enfriar los balones.

##### b) Destilación:

Se utilizó matraces de 250 mL en los cuales se colocaron 40 mL de ácido bórico al 4% y 5 gotas de indicador de verde de bromocresol. Luego estos fueron colocados en la parte inferior del equipo destilador. Después se programó en el equipo destilador: 40 mL de hidróxido de sodio al 45% y 150 mL de agua tipo 1 por 5 min para cada balón. El proceso finalizó cuando se dio la aparición de una solución verde azulada en los matraces colocados en la parte inferior del equipo.

c) Titulación:

Para esta última etapa se utilizó una solución valorada de ácido clorhídrico 0.0956 N, la cual fue colocada en una bureta para titular cada una de las soluciones contenidas en los matraces del proceso de destilación hasta el cambio de color verde azulado a amarillo intenso. Se anotó los gastos de ácido clorhídrico para cada muestra y para el blanco que sirvió de referencia para la titulación de las muestras.

El porcentaje de proteína total fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteína total} = 100 \times \left( \frac{1.4007 \times (V_M - V_B) \times N \times 6.25}{P_M} \right)$$

Donde:

$V_M$ : Volumen de gasto en mililitros de la muestra

$V_B$ : Volumen de gasto en mililitros del blanco

$N$ : Normalidad del ácido clorhídrico

$P_M$ : Peso en gramos de la muestra

#### 4.4.4. Determinación de grasas totales

Se realizó la determinación de grasas por el método de extracción con equipo Soxhlet. El análisis fue realizado por triplicado reportándose los resultados como porcentaje.

Para ello, se preparó un cartucho de papel filtro, en el cual se pesó 1 g de muestra de chocolate, y se colocó en la cámara de extracción del equipo Soxhlet. Después, se añadió 90 mL de éter de petróleo en un balón previamente tarado.

El sistema fue cerrado por completo y fue colocado sobre una plancha de calentamiento, dentro de una campana de extracción. Seguidamente, se inició el flujo de agua en el condensador y se prendió la plancha de calentamiento a temperatura moderada. Luego de 8 horas de reflujo, se dio por terminado el proceso y se procedió a retirar el sistema. Después, se evaporó el éter de petróleo en el rotavapor hasta sequedad completa del balón, el cual fue colocado en la estufa por 30 minutos a 40 °C y luego se dejó enfriar en el desecador. Finalmente, se determinó el peso de cada balón.

El porcentaje de grasas totales fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasas totales} = \frac{100 \times (P_{B+G} - P_B)}{P_M}$$

Donde:

$P_{B+G}$ : Peso del balón más grasa

$P_B$ : Peso del balón vacío

$P_M$ : Peso en gramos de la muestra

#### 4.4.5. Determinación de fibra total

Para la determinación de fibra total se pesó 0.5 g de muestra desengrasada y se colocó en un vaso de precipitado de 250 mL, al cual se le añadió 200 mL de ácido sulfúrico al 1.25%. Se procedió a agitar la mezcla con una bagueta con la finalidad de separar los grumos que se formaron. Luego, se colocó el vaso sobre una plancha de calentamiento y se hizo hervir el contenido por 30 min. Paralelamente, se armó el equipo de succión (bomba de vacío, matraz y embudo Büchner) y se puso a hervir agua destilada e hidróxido de sodio al 1.25% en vasos de precipitados.

Al término de los 30 min se encendió la bomba de succión y se filtró la solución caliente a través de un papel filtro que ya estaba colocado en el embudo Büchner. Seguidamente, se lavó el residuo con agua destilada caliente hasta lograr un pH neutro en el enjuague. El residuo lavado que quedó en el papel filtro fue transferido a un vaso de precipitado de 250 mL, al cual se le añadió 200 mL de hidróxido de sodio al 1.25% y se calentó a ebullición la mezcla por 30 min, Pasado dicho tiempo se realizó el mismo procedimiento de filtrado y lavado (con agua destilada caliente) de la muestra con la diferencia de que el papel filtro fue previamente pesado. Al final del proceso se obtuvo el residuo lavado que quedó en el papel filtro, el cual fue llevado a la estufa a 105 °C por espacio de tres horas. Luego de completar las tres horas, este fue colocado en el desecador y pesado hasta obtener peso constante. El ensayo fue realizado por triplicado reportándose el resultado como porcentaje.

El porcentaje de fibra total de la muestra fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibras totales} = \frac{100 \times (P_{PF+F} - P_{PF})}{P_M}$$

Donde:

$P_{PF+F}$ : Peso del papel filtro más fibra

$P_{PF}$ : Peso del papel filtro

$P_M$ : Peso en gramos de la muestra

#### 4.4.6. Determinación del porcentaje de carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos fue determinado por diferencia y partiendo de 100 g de muestra, al cual se le restó los componentes expresados en porcentaje de cenizas, proteínas, grasas y fibras.

El porcentaje de carbohidratos de la muestra fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - C - P - G - F$$

Donde:

*C*: Porcentaje de cenizas de la muestra.

*P*: Porcentaje de proteínas totales de la muestra.

*G*: Porcentaje de grasas totales de la muestra.

*F*: Porcentaje de fibras totales de la muestra.

#### 4.5. Determinación del perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos en las muestras de chocolate fue determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), utilizando el procedimiento descrito por Frank et al. (2005).<sup>37</sup>

Primero se extrajo la grasa presente en las muestras de chocolate para luego realizar la derivatización por metilación. Se pesó 100 mg de grasa obtenida por extracción con Soxhlet en un tubo de centrifuga con tapa rosca y se agregó 10 mL de n-pentano hasta completa disolución de la muestra. Luego se añadió 100 µL de una solución KOH/metanólica 2 N, para generar los metil ésteres de ácidos grasos. Seguidamente, se agitó la mezcla en un vortex por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm, el sobrenadante obtenido fue transferido con la ayuda de una pipeta Pasteur a un vial ámbar para su análisis en el GC-MS.

Se inyectó 2 µL de la muestra en el puerto de inyección del GC a 250 °C. Los análisis fueron realizados en un Cromatógrafo de gases acoplado a un Espectrómetro de masas; columna DB-5MS (60 m × 250 µm × 0.25 µm) con un flujo de gas helio de 1mL/min. Se programó una temperatura de 100 °C durante 1 minuto, después la temperatura aumentó 20 °C/min hasta 190 °C donde se mantuvo por 1 minuto, luego

incrementó la temperatura a 3 °C/min hasta la temperatura final de 210 °C. Se utilizó el puerto de inyección en modo split con una proporción de split de 200:1. Finalmente, los compuestos volatilizados ingresaron al espectrómetro de masas el cual los separó en función de su relación masa/carga, y sus espectros de masa fueron detectados, registrados y comparados con los espectros de masas de la librería NIST 08 y FLAVOR 02.

#### 4.6. Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales fue determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. Este ensayo se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotungstico. La transferencia de electrones reduce el complejo en óxidos de color azul intenso de tungsteno y molibdeno.

La preparación de las muestras fue realizada por el procedimiento descrito por Perea-Villamil y colaboradores (2009) con algunas modificaciones.<sup>38</sup>

Se inició pesando 0.5 g de muestra desengrasada de chocolate en tubos Falcon de 14 mL y se añadió 5 mL de etanol al 80%, se sonicó durante 5 min y se centrifugó la mezcla a 10 °C, 5000 rpm por 10 min. La extracción fue realizada tres veces. Al finalizar el proceso de centrifugación se colocaron los sobrenadantes obtenidos en fioles de 25 mL y se enrasaron con etanol al 80%. Se tomó 50 µL del extracto etanólico de cada lote y se añadió 1000 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu: agua destilada, 1:9). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se añadió 1000 µl de 7.5% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 970 µL de agua tipo 1. Inmediatamente, la solución se dejó en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente bajo oscuridad. Se leyó la absorbancia a 750 nm utilizando un espectrofotómetro. Como referencia se empleó una curva de calibración de ácido gálico, en el rango de 2-10 µg/mL.<sup>39</sup>

Este ensayo fue realizado por triplicado. Los fenoles totales fueron expresados como miligramos de equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra seca de chocolate (mg AGE/100 g muestra de chocolate).

#### 4.7. Determinación de catequina y epicatequina

Para su determinación, se inició con la extracción de muestras desengrasadas de chocolate de acuerdo al procedimiento descrito por Natsume y colaboradores (2000).<sup>40</sup> Se pesó 0.5 g de muestra desengrasada en tubos Falcon de 14 mL y se añadió 5 mL de etanol al 80%, se procedió a sonicar por 60 min. Seguidamente, se centrifugó la mezcla a 10 °C, 5000 rpm por 10 minutos. Luego, se colocó el sobrenadante en una fiola de 10 mL y se enrasó con etanol al 80%. Después se filtró la solución con ayuda de un filtro jeringa de 0.45 µm de tamaño de poro para luego proceder a inyectar (por triplicado) las disoluciones en el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC). Como referencia se preparó una curva de calibración pesando 1 mg de estándar externo de (+)-Catequina y 1 mg de estándar externo de (-)- Epicatequina en una fiola de 10 mL y se enrasó con etanol al 80%. A partir de las soluciones de estándares de catequina y epicatequina se realizaron 5 diluciones de 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 y 9.7 µg/mL y 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL; respectivamente.

Las condiciones cromatográficas con las cuales se trabajó fueron:

- Columna : RP-18e de 5 µm (LiChroCART® 250-4 )
- Fase móvil : Acetonitrilo (ACN) – Ácido acético 2.5%
- Gradiente :

Tiempo (min)	ACN (µL)	Ácido Acético 2.5% (µL)
0	7	93
18	7	93
19	80	20
22	100	0
25	100	0
27	5	95
30	5	95

- Flujo: 1mL/min
- Longitud de onda: 280 nm
- Temperatura: 40 °C
- Tiempo de análisis: 30 min
- Volumen de inyección de la muestra: 10 µL

Los contenidos de estos flavan-3-oles fueron expresados como mg de catequina/100 g de chocolate y mg de epicatequina/100 g de chocolate.

#### 4.8. Actividad antioxidante

##### 4.8.1. Test de DPPH

La actividad antioxidante fue determinada de acuerdo al método propuesto por Othman y colaboradores.<sup>41</sup> Este método colorimétrico de evaluación de la actividad antioxidante se basa en la reducción del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el cual presenta una coloración violeta que se pierde progresivamente a medida que reacciona con los compuestos antioxidantes de la muestra, produciendo un descenso de la absorbancia a 517 nm.<sup>42</sup> El mecanismo de acción se basa en la transferencia de un radical de hidrógeno de la especie antioxidante al radical, lo cual se ve reflejado en el cambio de color de violeta a amarillo.

Para la preparación de los extractos etanólicos se pesó 0.5 g de muestra desengrasada del chocolate en tubos Falcon de 14 mL y se añadió 5 mL de etanol al 80%, se agitó por 5 min y luego se centrifugó la mezcla a 10 °C, 5000 rpm por 10 min. La extracción fue realizada tres veces. Al término del proceso de centrifugación se colocaron los sobrenadantes obtenidos en fioles de 25 mL y se enrasó con etanol al 80%. Adicional a ello, se preparó una solución de ácido ascórbico a una concentración de 0.7 mg/mL que fue utilizada como control de referencia.

Partiendo de los extractos etanólicos se prepararon diluciones de 0.1 - 0.5 mg/mL. Se tomó 50  $\mu$ L de solución, se añadió 3950  $\mu$ L de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de 100  $\mu$ M en etanol al 80%. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó durante 30 min en reposo a temperatura ambiente bajo oscuridad. Terminado este tiempo se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm usando un espectrofotómetro. El análisis fue realizado por triplicado. La concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ) es la concentración necesaria para la neutralización del 50% de los radicales libres de DPPH), la cual se obtiene de la curva de calibración entre el porcentaje de actividad antioxidante versus la concentración de la muestra (mg/mL).

El porcentaje de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las muestras secas de chocolate fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \frac{(1 - \text{Absorbancia de la muestra})}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

#### 4.8.2. Test ORAC

El método ORAC fue llevado a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Ou, Hampsch-Woodill, and Prior (2001).<sup>43</sup> Este método mide la capacidad que tienen los antioxidantes presentes en la muestra para proteger a la fluoresceína del daño oxidativo. El mecanismo de acción se basa en la transferencia de un átomo de hidrogeno del antioxidante al radical peroxilo (ROO·) generado por la descomposición térmica del 2,2-azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), como consecuencia se ve inhibida la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína. Por el contrario, la pérdida de fluorescencia es el indicador de la extensión de la oxidación debido al radical peroxilo (ROO·).<sup>44</sup>

Por otro lado, el método es utilizado comúnmente para medir la actividad antioxidante de muestras lipofílicas e hidrofílicas, en este caso se trabajó con muestras hidrofílicas (muestra desengrasada del chocolate).<sup>45</sup>

La preparación de las muestras fue realizada de acuerdo al procedimiento descrito por Todorovic y colaboradores (2015) con algunas modificaciones.<sup>46</sup> Primero, se pesó 250 mg de muestra desengrasada en tubos Falcon de 14 mL y se añadió 5 mL del solvente Acetona: agua destilada: ácido acético (AWA) (70: 29.8: 0.2 v/v/v) a cada tubo. Seguidamente, se utilizó el ultrasonido para agitar la solución por 30 min y luego se centrifugó a 4 °C, 3000 rpm por 10 min. La extracción fue realizada dos veces.

Al finalizar el proceso de centrifugación, se colocaron los sobrenadantes obtenidos en fiolas de 10 mL y se enrasó con solvente AWA. Después, se realizó la dilución de las muestras, para ello se agregó 4992  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 10 mM a pH 7.4 en tubos de ensayos y se adicionó 8  $\mu\text{L}$  de muestra.

Se utilizó Trolox (análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E), como compuesto antioxidante de referencia para la preparación de una curva de calibración (rango de 5 a 40  $\mu\text{M}$ ). Los volúmenes que se tomaron fueron 5, 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{L}$  de la solución de trolox 0.5 mg/mL llevándolos a un volumen final de 2 mL con buffer fosfato (10 mM, pH 7.4). Después, se realizó la dilución de la fluoresceína a 1  $\mu\text{M}$  para lo cual se tomó

10  $\mu\text{l}$  de solución de fluoresceína 1 mM y se realizó la dilución llevándolo a un volumen de 10 mL con buffer fosfato (10 mM, pH 7.4). En una microplaca, utilizando una pipeta multicanal, se agregó en el siguiente orden los siguientes componentes: 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína 1  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{L}$  de solución de trolox preparada o muestra diluida y se incubó en la estufa a 37 °C por 30 min. Paralelamente se preparó un blanco que contenga 150  $\mu\text{L}$  de fluoresceína 1  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{L}$  de solución buffer fosfato (10 mM, pH 7.4). Terminando este tiempo, se añadió 25  $\mu\text{L}$  de AAPH 250 mM a cada pozo de la microplaca utilizando la pipeta multicanal. Las lecturas de fluorescencia del blanco, estándar y muestras fueron realizadas por triplicado. El software utilizado para el control fácil de dichas lecturas fue el Mikrowin 2000.

La intensidad de la fluorescencia fue medida cada 2 minutos a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520, respectivamente, utilizando el lector de fluorescencia (Hidex Chamaleon), hasta que el valor final de la concentración mayor de trolox (40  $\mu\text{M}$ ) sea 10 veces menor que su valor inicial.

Finalizando las lecturas, los datos fueron exportados a una hoja Excel para determinar el área bajo la curva de descenso de la fluorescencia (AUC) y el área bajo la curva neta (NetAUC) utilizando las siguientes fórmulas:

$$AUC = 1 + \sum_{i=2}^{i=n} \frac{f_i}{f_0}$$

Donde:

$f_0$  = Fluorescencia inicial leída al tiempo 0 minutos

$f_i$  = Fluorescencia leída al tiempo i

$$net\ AUC = AUC_{antioxidante} - AUC_{blanco}$$

Donde:

$AUC_{antioxidante}$  = Área bajo la curva en presencia de antioxidante

$AUC_{blanco}$  = Área bajo la curva del blanco (sin presencia de antioxidante)

La ecuación de regresión lineal obtenida de la curva de calibración de trolox fue necesaria para determinar la actividad antioxidante de las muestras de chocolate, la cual fue expresada como  $\mu\text{mol TE/g}$  de chocolate.

#### 4.9. Determinación de metilxantinas (teobromina y cafeína)

Para la determinación de teobromina y cafeína se pesó 0.2 g de muestra desengrasada de chocolate y se sometió a reflujo con 40 mL de agua tipo 1 por 30 minutos. El extracto acuoso obtenido fue centrifugado a 5000 rpm durante 5 min, luego el sobrenadante fue llevado a una fiola de 50 mL, la cual fue enrasada con agua tipo 1. Dos mililitros de esta solución fueron eluidos a través de cartuchos Sep-pak C18 (previamente acondicionados con 2 mL de metanol) con 5 mL de agua tipo 1.

Los analitos fueron eluidos del cartucho Sep-pak C18 con 10 mL de cloroformo, los cuales fueron colectados en un balón de vidrio para evaporar dicho solvente con la ayuda del rotavapor. Los residuos obtenidos en dichos balones fueron disueltos con 5 mL de agua tipo 1 y pasados por filtros jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para luego proceder a la inyecciones de 20  $\mu\text{L}$  de la disolución en el Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC).<sup>47</sup>

Adicional a ello, se elaboró una curva de calibración con estándares externos de Teobromina y Cafeína, por tal motivo se pesó 1 mg de cafeína y 1.5 mg de teobromina en fiolas de 10 mL, enrasando luego con agua tipo 1. A partir de la solución estándar se realizaron 5 diluciones de 6, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g/mL}$  y 2, 3, 4, 6, 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Las condiciones cromatográficas con las cuales se trabajó fueron:

- Columna: RP-18e de 5  $\mu\text{m}$  (LiChroCART<sup>®</sup> 250-4 )
- Fase móvil: Agua – Acetonitrilo (8:2)
- Gradiente:

Tiempo (min)	Agua Ultrapura Tipo I ( $\mu\text{L}$ )	ACN ( $\mu\text{L}$ )
0	90	10
3	90	10
5	80	20
9	80	20

11	90	10
13	90	10

- Tiempo de análisis : 13 min
- Flujo : 1 mL/ min
- Longitud de onda : 276 nm
- Temperatura: 25 °C
- Volumen de inyección de muestra: 20 µL

Los contenidos de las metilxantinas fueron expresados como mg de teobromina/100 g de muestra de chocolate y mg de cafeína/100g de muestra de chocolate.

#### 4.10. Determinación del perfil de compuestos volátiles

En un vial de 25 mL se agregó 2 g de chocolate, se cerró herméticamente y se llevó a un baño de ultrasonido por 5 min. Posteriormente se expuso la fibra SPME al espacio de cabeza del vial por 30 min a 60 °C. Cumplido el tiempo de extracción, se retiró la fibra del espacio de cabeza.

Los compuestos volátiles atrapados en la fibra fueron desorbidos a 250 °C en el puerto de inyección del GC y eluidos por la columna cromatográfica. Los experimentos se realizaron en un GC-MS; columna DB-WAX 60m; rampa de temperaturas: 40 °C por 10 min, se incrementó a 120 °C a 5 °C/min durante 5 min, se siguió incrementando a 240 °C a 10 °C/min durante 15 min y manteniendo la temperatura por 2 min, usando helio como gas transportador a 1 mL/min, con un tiempo de corrida total de 58 min.

Para la determinación de la composición química de los compuestos volátiles de los chocolates, se realizó la comparación de sus espectros de masas con los espectros de masas de las bases de datos NIST 08 y Flavor 02, eligiendo aquellos que presentaban un mayor porcentaje de probabilidad (>70%).<sup>48</sup>

#### 4.11. Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS versión 19. La prueba utilizada fue T- student asumiendo que las varianzas son iguales. Con ello se determinó si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los promedios de cada variable de ambos lotes.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Composición proximal de las muestras

En la tabla 1, se muestran los resultados del análisis proximal de dos lotes de producción del chocolate “Valle del Chanka”.

Los resultados se encuentran expresados como porcentaje  $\pm$  desviación estándar obtenidos del promedio de los resultados de cada análisis por triplicado.

Ambos lotes destacan por su contenido de grasa y carbohidrato.

Tabla 1. Análisis Proximal del chocolate “Valle del Chanka”

ANÁLISIS PROXIMALES	CONTENIDO (%)	
	Lote 1407004	Lote 1506001
% Grasa	53.6 $\pm$ 0.3	53.2 $\pm$ 0.4
%Fibra	2.5 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.0
%Proteínas	7.3 $\pm$ 0.0	7.1 $\pm$ 0.0
%Cenizas	1.8 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1
%Carbohidratos	34.8 $\pm$ 0.3	35.1 $\pm$ 0.4

%Humedad	Lote 1407004	Lote 1506001
	1.9 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0

Hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos lotes para los promedios de los análisis de humedad, proteína, fibra y carbohidratos.

## 5.2. Perfil de ácidos grasos

En las figuras 1 y 2 se muestran los cromatogramas de los ácidos grasos obtenidos de dos lotes de producción del chocolate "Valle del Chanka".

Estos análisis fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

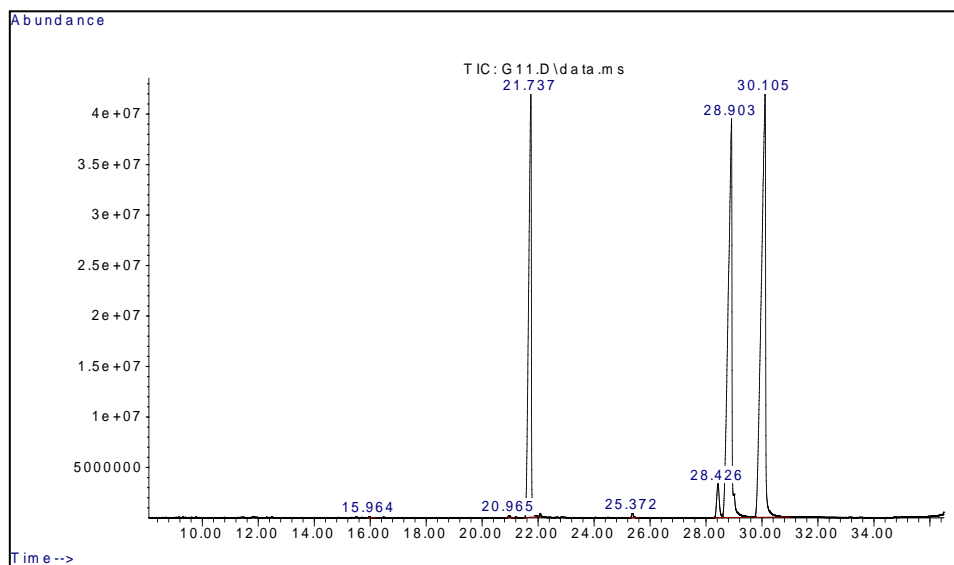


Figura 1. Cromatograma de gases del perfil de ácidos grasos del lote 1407004

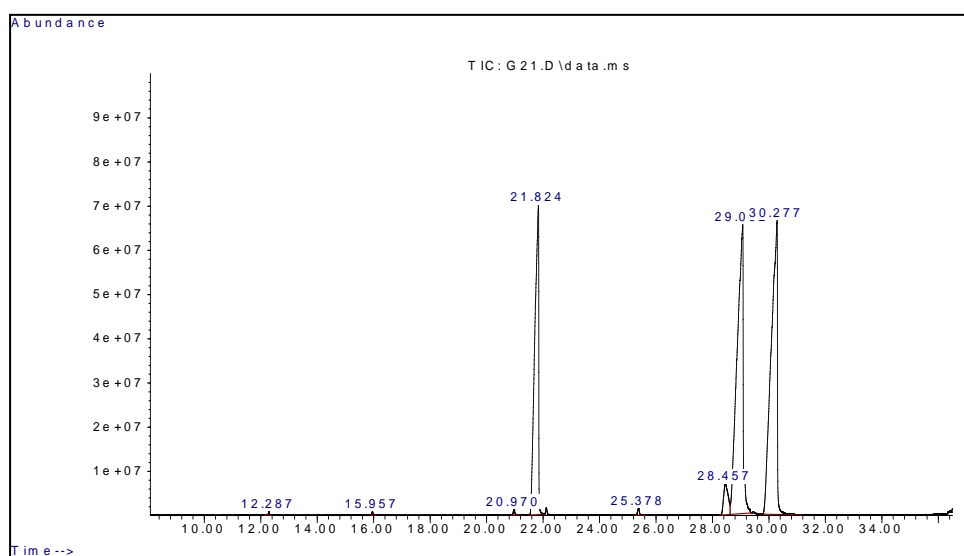


Figura 2. Cromatograma de gases del perfil de ácidos grasos del lote 1506001

En la tabla 2 se muestran los tiempos de retención ( $t_R$ ) y porcentaje (concentración relativa) de cada uno de los ácidos grasos.

Los principales ácidos grasos fueron: esteárico (39.8%), palmítico (24.2%) y oleico (33.8%).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos del chocolate “Valle del Chanka”

ÁCIDOS GRASOS	Lote 1407004		Lote 1506001	
	$t_R$ (min)	% (Concentración relativa)	$t_R$ (min)	% (Concentración relativa)
Ácido mirístico (14:0)	16.0	0.0	16.0	0.0
Ácido palmitoleico (16:1)	21.0	0.1	21.0	0.1
Ácido palmítico (16:0)	21.7	24.4	21.8	23.9
Ácido margárico (17:0)	25.4	0.2	25.4	0.2
Ácido linoleico (18:2) cis n6	28.4	1.9	28.5	1.9
Ácido oleico (18:1) - cis n9	28.9	33.5	29.0	34.0
Ácido esteárico (18:0)	30.1	39.8	30.3	39.8

### 5.3. Contenido de polifenoles totales, catequina y epicatequina

Para la determinación del contenido de polifenoles totales en dos lotes de producción del chocolate “Valle del Chanka” se utilizó la curva de calibración de ácido gálico mostrada en la figura 3.

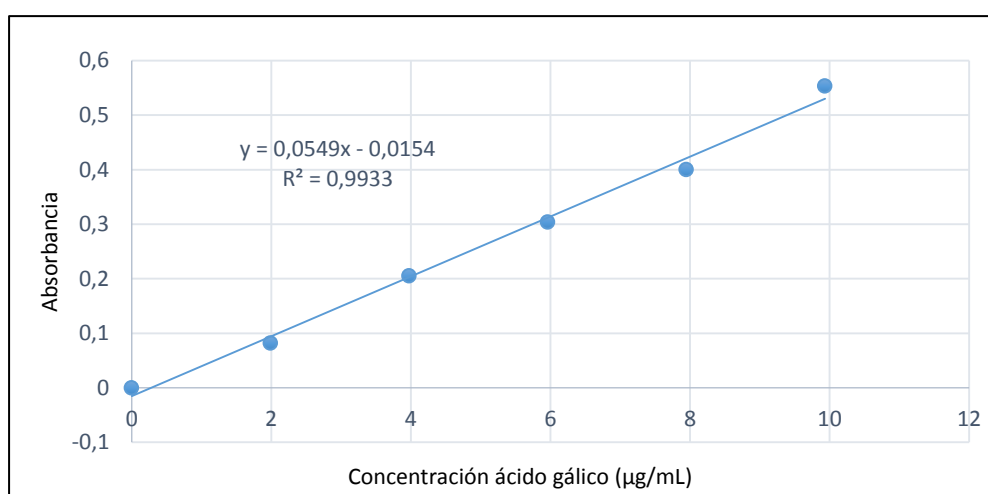


Figura 3. Curva de calibración de ácido gálico

Para la determinación de catequina y epicatequina presentes en ambos lotes del chocolate “Valle del Chanka” se utilizaron las curvas de calibración mostradas en las figuras 4 y 5.

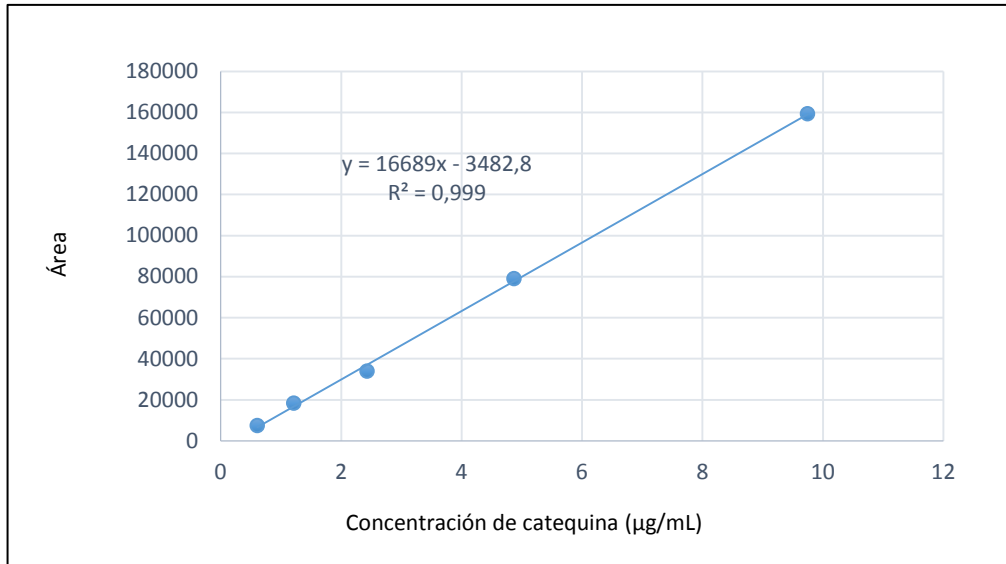


Figura 4. Curva de calibración de catequina

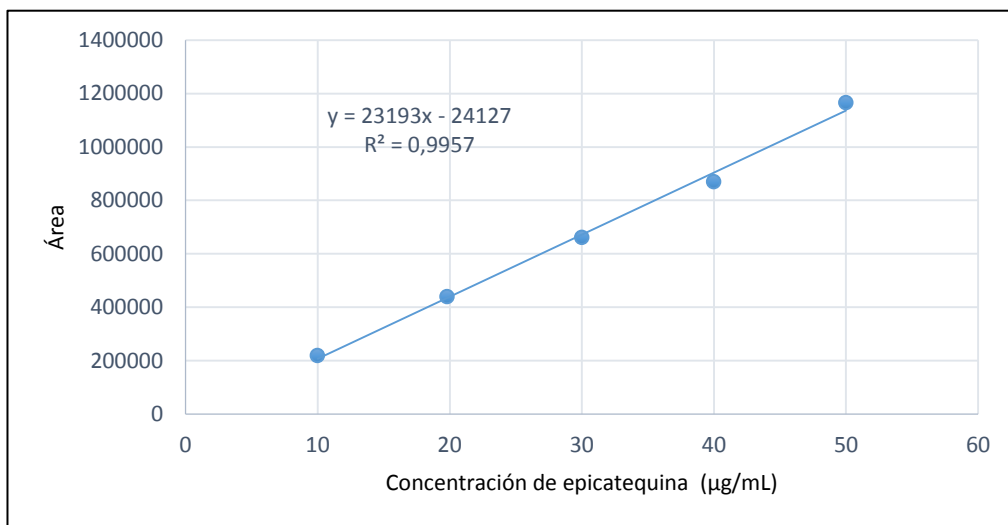


Figura 5. Curva de calibración de epicatequina

En las figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas de catequina y epicatequina obtenidos de ambos lotes.

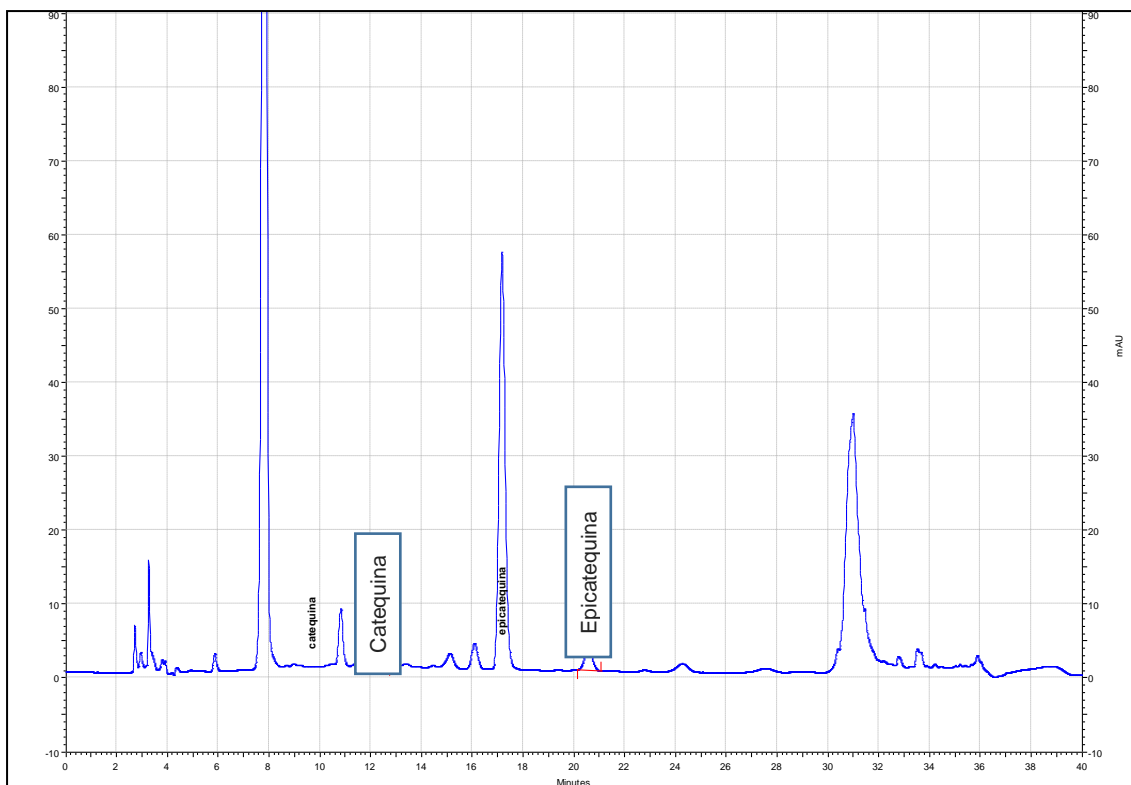


Figura 6. Cromatograma HPLC obtenido para catequina y epicatequina del lote 1407004

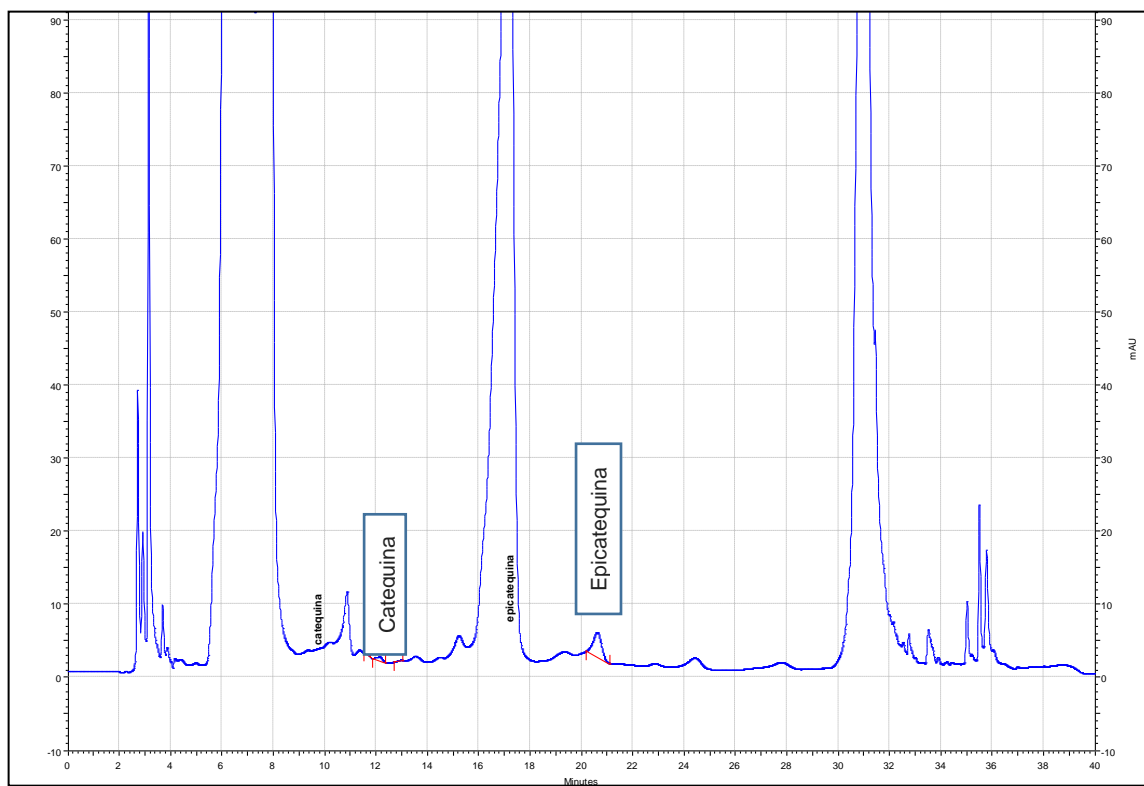


Figura 7. Cromatograma HPLC de catequina y epicatequina del lote 1506001

En la tabla 3 se muestran los contenidos de polifenoles totales, catequina y epicatequina expresados como mg ácido gálico equivalente (EAG)/100 g chocolate, mg catequina/100 g chocolate y mg epicatequina/100 g chocolate, respectivamente.

El contenido de compuestos fenólicos, catequina y epicatequina fue mayor en el lote 1506001 que en el lote 1407004. Para ambos lotes, el contenido de epicatequina fue mayor que el contenido de catequina.

Hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos lotes en el contenido de fenoles totales, catequina y epicatequina.

Tabla 3. Contenido de polifenoles totales, catequina y epicatequina en dos lotes del chocolate "Valle del Chanka" 72%

<b>MUESTRAS</b>	<b>FENÓLICOS TOTALES (mg EAG/100 g chocolate)</b>	<b>CATEQUINA (mg/100 g chocolate)</b>	<b>EPICATEQUINA (mg/100 g chocolate)</b>
Lote 1407004	678.5 ± 3.0	1.6 ± 0.0	23.9 ± 0.5
Lote 1506001	794.0 ± 2.6	2.2 ± 0.0	26.4 ± 0.6

#### 5.4. Actividad antioxidante

##### 5.4.1. Test de DPPH

La actividad antioxidante del ácido ascórbico (control) y los extractos etanólicos de las muestras de chocolate son expresadas como  $EC_{50}$  (concentración necesaria del extracto para neutralizar el 50% de los radicales DPPH), las cuales fueron determinadas a partir de las curvas de concentración versus porcentaje de actividad antioxidante (Figuras 8 a 10).

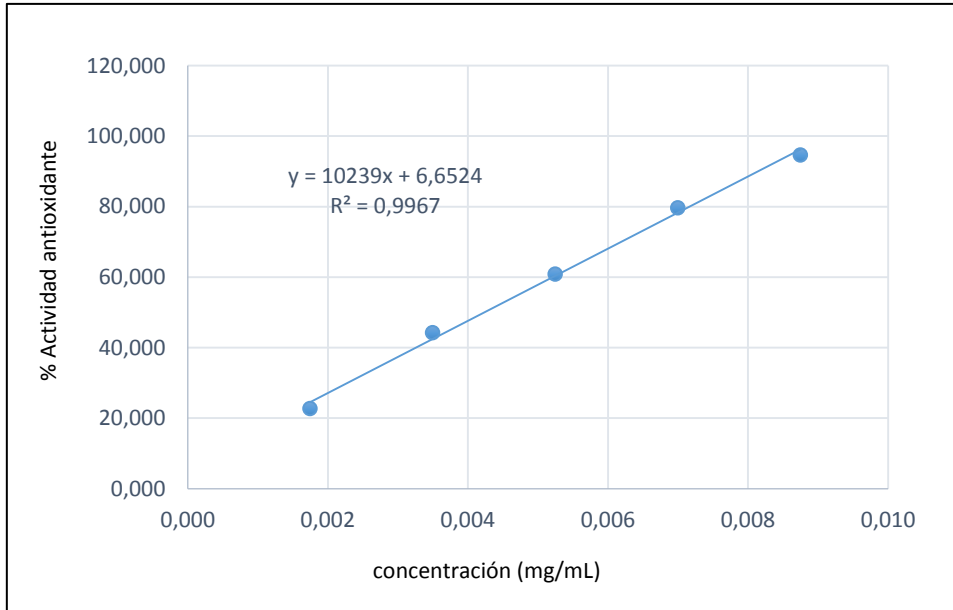


Figura 8. Curva de concentración versus porcentaje de actividad antioxidante del ácido ascórbico

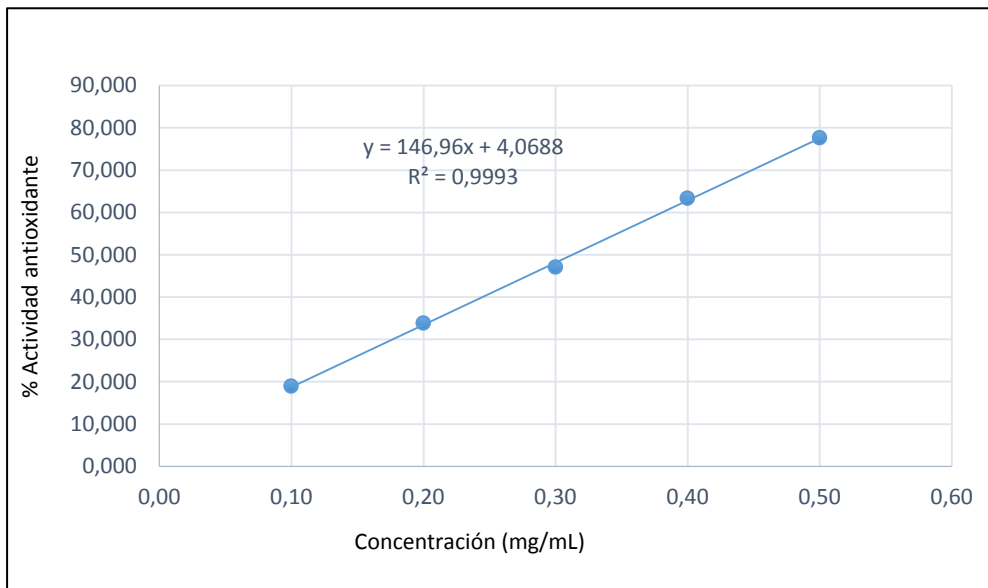


Figura 9. Curva de concentración versus porcentaje de actividad antioxidante del extracto etanólico del lote 1407004

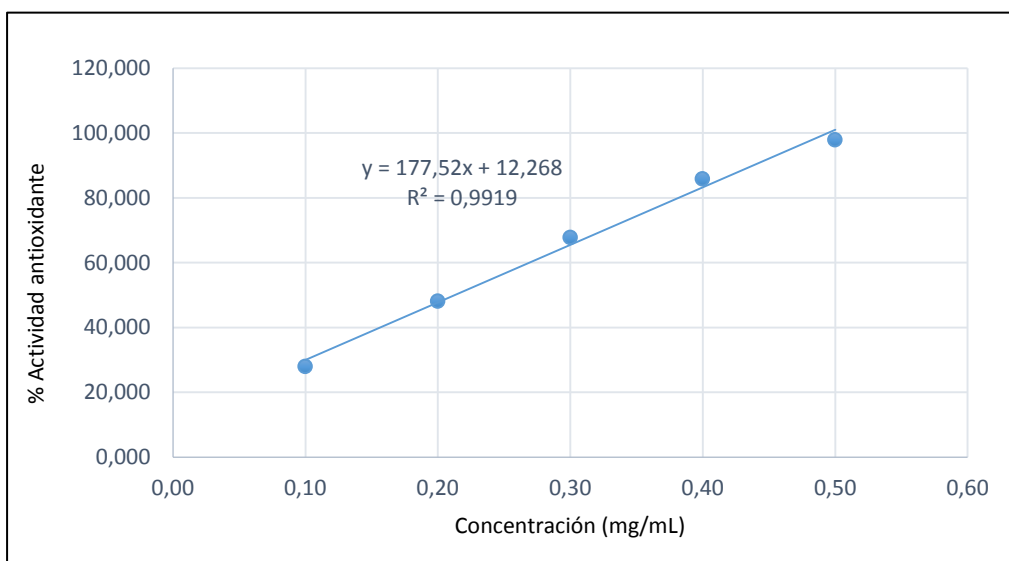


Figura 10. Curva de concentración versus porcentaje de actividad antioxidante del extracto etanólico del lote 1506001

En la tabla 4 se muestran los resultados de actividad antioxidante expresada como  $EC_{50}$  de los extractos etanólicos de dos lotes de producción del chocolate “Valle del Chanka” y del ácido ascórbico (control) expresados como miligramos de extracto etanólico por mililitro de solución.

Cabe notar que el ácido ascórbico tiene una  $EC_{50}$  mucho menor que la de las muestras de ambos lotes del chocolate.

Hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad antioxidante de ambos lotes del chocolate.

Tabla 4. Concentraciones efectivas medias de las muestras de chocolate y el ácido ascórbico

MUESTRA	$EC_{50}$ (mg extracto/mL)
Lote 1407004	$0.300 \pm 0.020$
Lote 1506001	$0.200 \pm 0.010$
Ácido ascórbico	$0.004 \pm 0.001$

### 5.4.2. Test de ORAC

En la figura 11 se muestra cómo la intensidad de la fluorescencia disminuye en el tiempo debido a la reacción del AAPH con los compuestos antioxidantes preparados a diferentes concentraciones (Trolox y extracto de dos lotes del chocolate). A su vez se preparó un blanco (fluoresceína más solución buffer) para su comparación.

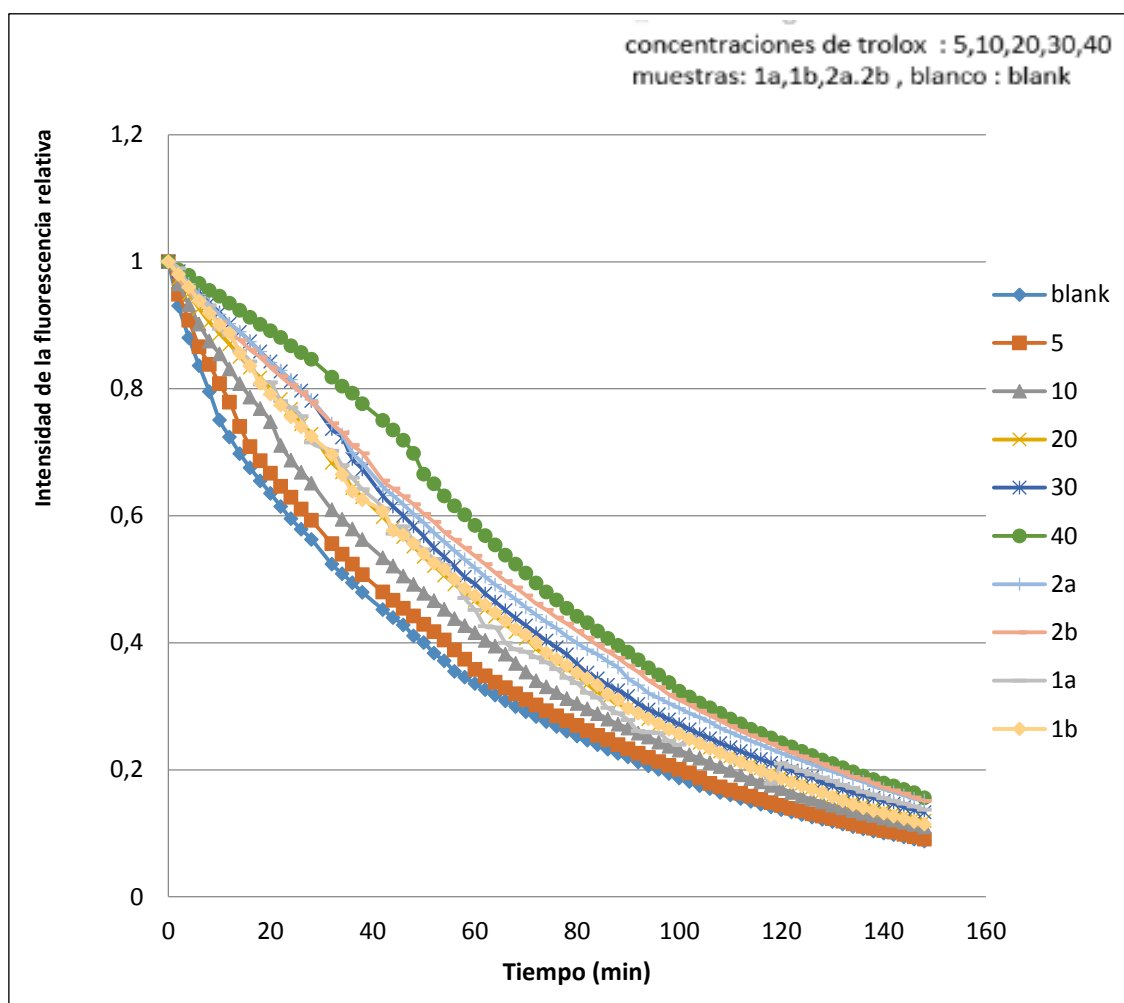


Figura 11. Curvas de caída de la intensidad de fluorescencia en el tiempo

La ecuación de regresión lineal se obtuvo de la curva de calibración de trolox mostrada en la figura 12, que fue necesaria para determinar la actividad antioxidante de los extractos de ambos lotes del chocolate, y fueron expresados como  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de trolox (TE)/g de muestra de chocolate (Tabla 5).

Hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los resultados del test de ORAC de los lotes de chocolate.

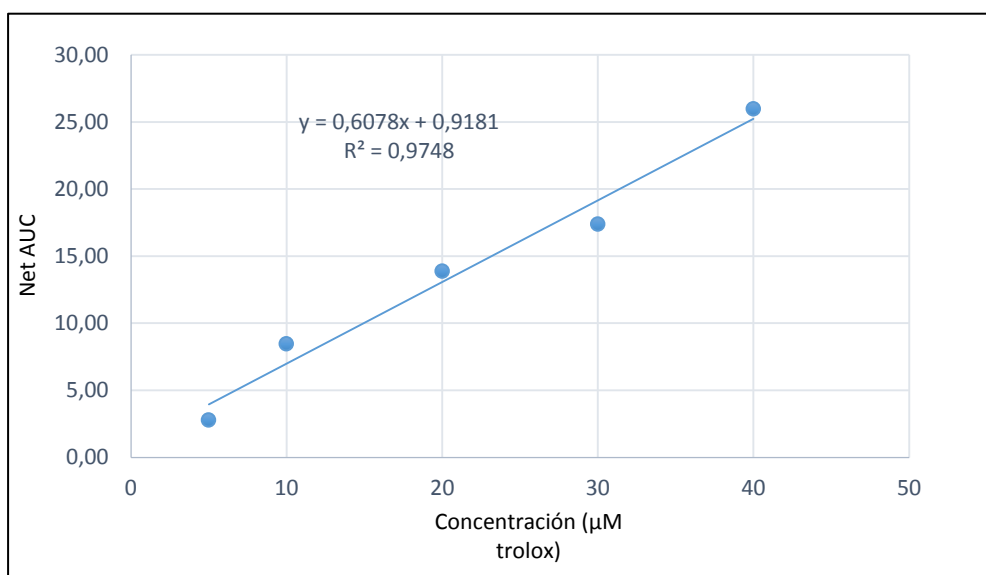


Figura 12. Curva de calibración de trolox

Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos de dos lotes del chocolate “Valle del Chanka”

MUESTRAS	µmol TE/ g chocolate
Lote 1407004	978.4 ± 36.4
Lote 1506001	668.5 ± 3.3

### 5.5. Contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína)

Para la determinación del contenido de teobromina y cafeína del extracto acuoso se utilizaron las curvas de calibración mostradas en las figuras 13 y 14.

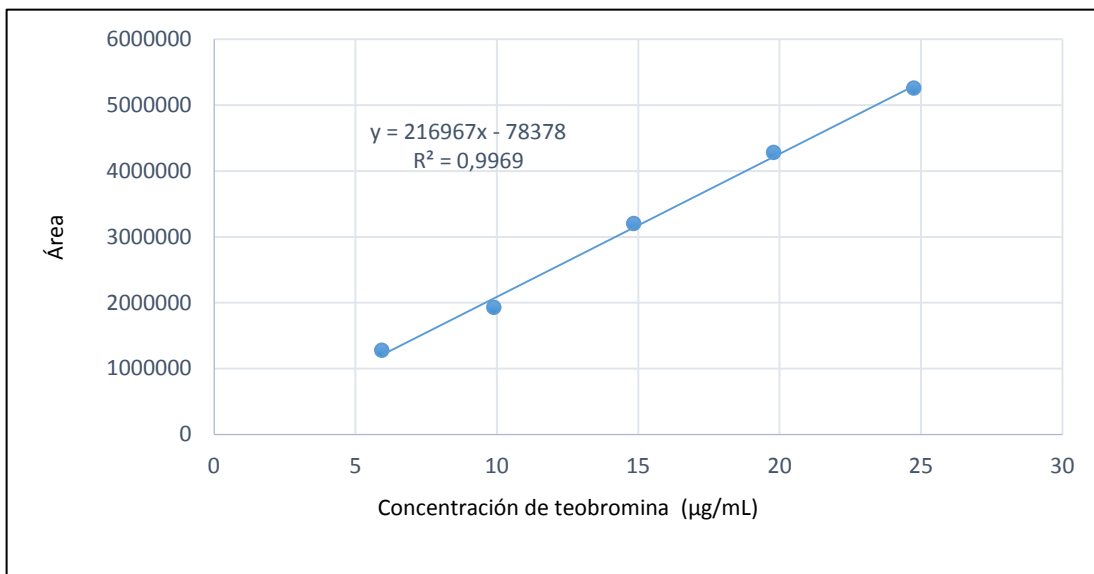


Figura 13. Curva de calibración de teobromina

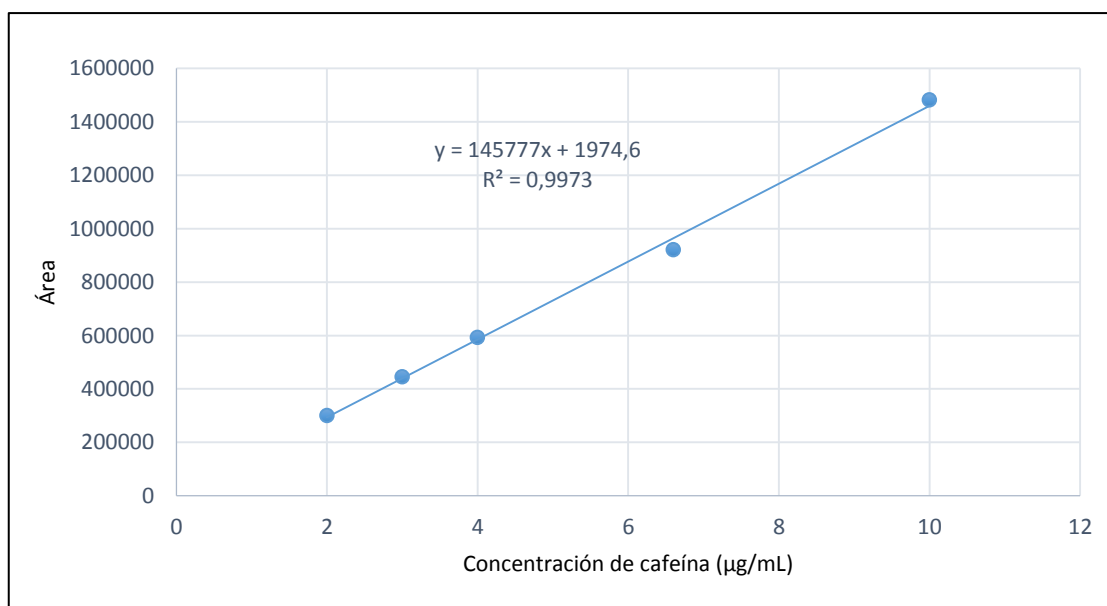


Figura 14. Curva de calibración de cafeína

En las figuras 15 y 16 se muestran los cromatogramas de teobromina y cafeína de ambos lotes de producción del chocolate.

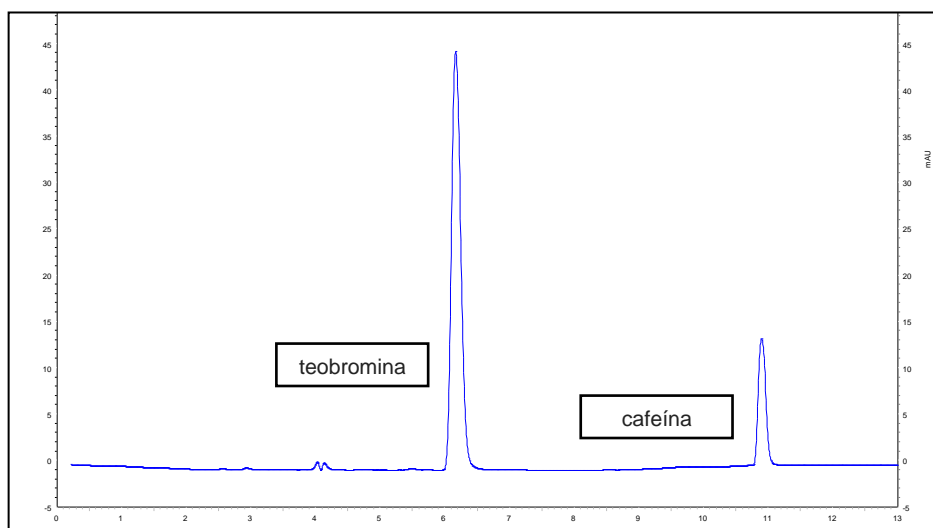


Figura 15. Cromatograma HPLC de teobromina y cafeína en el lote 1407004

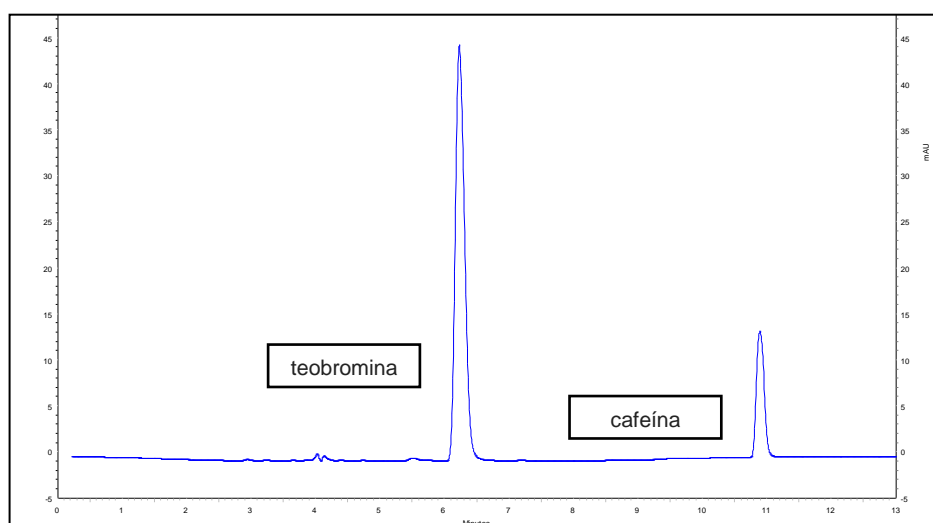


Figura 16. Cromatograma HPLC de teobromina y cafeína en el lote 1506001

En la tabla 6 se muestran los contenidos de teobromina y cafeína que fueron determinados por cromatografía HPLC, expresados como miligramos de teobromina por 100 g de muestra de chocolate y miligramos de cafeína por 100 g de muestra de chocolate.

El contenido de teobromina y cafeína fue mayor en el lote 1506001 que en el lote 1407004. Para ambos lotes el contenido de teobromina fue casi 4 veces mayor que el contenido de cafeína.

Hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos lotes para los promedios de Teobromina y Cafeína.

Tabla 6. Contenido de metilxantinas en dos lotes del chocolate “Valle del Chanka”

<b>MUESTRAS</b>	<b>METILXANTINAS (mg/ 100g chocolate)</b>	
	<b>teobromina</b>	<b>cafeína</b>
Lote 1407004	521.3 ± 2.2	136.2 ± 1.0
Lote 1506001	526.9 ± 1.6	148.7 ± 3.3

#### 5.6. Perfil de compuestos volátiles

En las figuras 17 y 18 se observan los cromatogramas de gases obtenidos tras el análisis por GC-MS de las sustancias volátiles extraídas por SPME de las muestras de dos lotes del chocolate “Valle del Chanka”

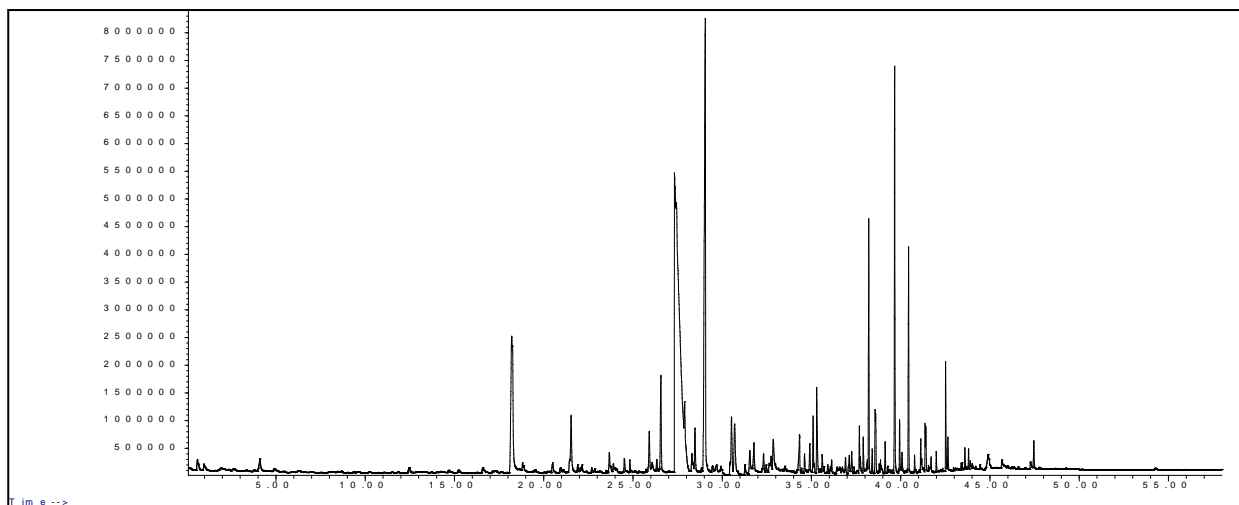


Figura 17. Cromatograma de gases de los compuestos volátiles del lote 1407004

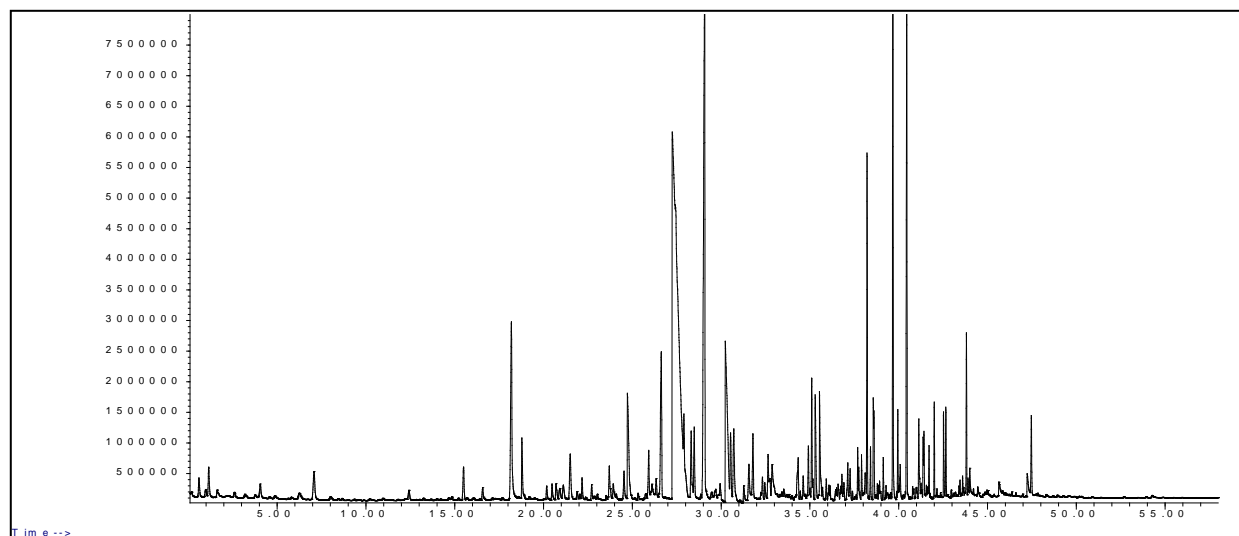


Figura 18. Cromatograma de gases de los compuestos volátiles del lote 1506001

A partir de los espectros de masas de cada uno de los picos obtenidos para cada lote de producción del chocolate y utilizando las bases de datos NIST 08 y Flavor 02, se logró detectar 29 compuestos que se muestran en la tabla 7.

Los compuestos mayoritarios fueron el ácido acético (30.7%) y 3,6-dimetilpirazina (40.7%).

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos de dos lotes del chocolate “Valle de Chanka”

COMPUESTOS VOLÁTILES	t <sub>R</sub> (min)	Lote 1407004		Lote 1506001	
		CONTENIDO RELATIVO (%)	PROBABILIDAD	CONTENIDO RELATIVO (%)	PROBABILIDAD
Limoneno	18.2	2.4	92	2.6	92
p-cimeno	21.4	1.4	90	1.9	90
Homofuronol	24.7	2.3	95	2.3	95
2- nonano	25.9	0.9	90	0.6	90
Trimetilpirazina	26.5	2.1	90	2.7	90
Ácido acético	27.4	30.5	95	30.9	95
3,6-dimetilpirazina	29.3	40.5	97	40.9	97
2,3,5-Trimetil-6-etilpirazina	30.5	1.6	94	1.1	94
Benzaldehído	30.7	1.8	97	1.5	97
Linalool	31.8	0.9	90	0.9	90
2,3-Butanodiol	32.9	0.9	90	0.5	90
Ácido butanoico	34.2	0.2	92	0.2	92
Desconocido	34.3	0.5	-	0.5	-
Acetofenona	34.9	1.7	91	1.8	91
2-Furanometanol	35.1	0.5	97	0.4	97
3 metil-ácido butanoico	35.3	2.3	78	0.4	78
Desconocido	36.9	0.6	-	0.8	-
Desconocido	37.3	0.3	-	0.4	-
Etil éster del ácido bencenoacético	37.7	0.8	90	0.8	90
Desconocido	37.9	0.2	-	0.2	-
2-feniletil éster del ácido propanoico	38.2	0.2	83	0.4	83
Ácido hexanoico	38.6	0.4	90	1.9	90
Alcohol fenético	39.7	1.4	90	0.4	90
Etanona	40.4	0.8	80	0.1	80
Ácido octanoico	41.4	0.2	84	1.5	84
5-Metil-2-fenil-2-hexenal	41.7	1.4	90	1.8	90
Ácido nonanoico	42.5	1.7	92	0.7	92
Cafeína	44.9	1.0	95	0.9	95
Vanilina	47.5	0.3	95	0.9	95

## VI. DISCUSIÓN

El análisis del perfil químico-nutricional y actividad antioxidante del chocolate nos permite evaluar, monitorear y mejorar su proceso de elaboración. Asimismo, nos permite conocer su composición nutricional y energética.

Los chocolates generalmente son elaborados con: pasta de cacao, manteca de cacao, azúcares y otros ingredientes (leche, frutas secas).<sup>49</sup> Estudios realizados en granos de cacao y chocolates de Ghana y Ecuador nos muestran que ambos presentan altos contenidos de grasa y carbohidratos. Sin embargo los granos de cacao poseen un contenido mayor de grasa (>40%) y menor cantidad de carbohidratos (>32%) en comparación con el chocolate que tiene un mayor contenido de carbohidratos (>55%) y menor cantidad de grasa (>30%). Dicha diferencia de contenidos se pudo dar debido a que durante el proceso de manufactura del chocolate, el azúcar añadido es significativamente mayor que la cantidad de manteca de cacao presente. Adicional a ello la procedencia, tipo de cacao y condiciones de crecimiento son factores determinantes en la obtención la manteca de cacao.<sup>50</sup>

El chocolate Valle del Chanka presenta en su composición nutricional un bajo contenido de carbohidratos (35%) y alto contenido de grasas (53.4%) en comparación con los chocolates de Ghana y Ecuador. Por el contrario, presentó un contenido nutricional similar en comparación con los granos de cacao de Ghana y Ecuador.

Los productos derivados del cacao, como el chocolate, son conocidos por su gran potencial energético y nutricional.<sup>50</sup> En este caso, el chocolate Valle del Chanka contiene un valor energético mayor (649.4 Kcal/100 g) que el chocolate oscuro Hershey (574 Kcal/100 g) debido a su alto contenido de grasa (53.43%).

El cacao proporciona 293 Kcal por cada 100 gramos y el chocolate, según su composición aporta entre 450 y 600 Kcal. Debido a su alto aporte energético es considerado un producto recomendable en situaciones que requieran un aporte energético extra como por ejemplo, en la práctica de deportes o la realización de ejercicios físicos intensos.<sup>51</sup>

En la manteca del cacao, los triglicéridos de los ácidos grasos mayoritarios son: esteárico, oleico y palmítico,<sup>49</sup> los cuales también se encuentran presentes como

ácidos grasos mayoritarios en los chocolates de Ghana y Ecuador con un porcentaje de 36.4%, 32.4% y 27.5%, respectivamente.<sup>50</sup>

Los ácidos grasos mayoritarios encontrados en el chocolate “Valle del Chanka” son: esteárico (39.8%), oleico (33.8%) y palmítico (24.2%), los cuales guardan cercana similitud con los porcentajes de ácidos grasos presentes en los chocolate de Ghana y Ecuador. Cabe decir que la cantidad de ácidos grasos presente en los granos de cacao y sus derivados variará de acuerdo a su procedencia geográfica.

Investigaciones han demostrado que el ácido esteárico, a pesar de ser un ácido graso saturado no aumenta el nivel de colesterol en la sangre, no es aterógeno, propiedad que también contribuye a la mejora de la salud cardiovascular de las personas que consumen de manera frecuente el cacao y sus derivados (chocolate). El exceso de ácido esteárico es convertido en ácido oleico mediante una enzima desaturasa en el hígado y luego recircula esterificado en los triglicéridos presentes en la lipoproteína VLDL, por lo que no tiene poder hipercolesterolémico, por esto no eleva los niveles de colesterol en el plasma en la fase post-hepática.<sup>21</sup>

El contenido de compuestos fenólicos de diversos chocolates provenientes de Serbia fluctúan entre 721 – 1265 mg EAG/100 g.<sup>46</sup> Al compararlos con el chocolate Valle del Chanka (736.3 mg EAG/100 g) podemos notar que el contenido de compuestos fenólicos obtenidos se encuentra dentro del rango.

Cabe decir que dichos compuestos bioactivos pueden variar de acuerdo a las variedades de cacao y región de cultivo.<sup>52</sup> Se ha demostrado que procesos tales como fermentación, secado y alcalinización contribuyen también a la degradación de los compuestos fenólicos.<sup>53</sup>

Durante la elaboración del chocolate, el proceso de tostado es importante ya que da como resultado el sabor, color y textura del producto. Sin embargo, estos cambios positivos también pueden ir acompañado de reacciones que reducen el contenido de polifenoles.<sup>54</sup>

Catequina y epicatequina son los principales flavonoides presentes en el cacao y el chocolate, en donde la epicatequina es el compuesto más activo y responsable de los efectos sobre la salud *cardiovascular*.<sup>55</sup>

Los contenidos de catequina y epicatequina en muestras de chocolates oscuros proveniente de Serbia fluctúan entre 11.3 – 18.3 y 22.3 – 26.3 mg/100g,

respectivamente. Siendo menor el contenido de estos flavonoides en los chocolates de leche (1.0 - 7.7 y 13.6 – 14.7 mg/100g, respectivamente).<sup>46</sup>

Otro estudio muestra que los contenidos de catequina y epicatequina de chocolates oscuros procedentes de Turquía fluctúan entre 2.4 – 6.9 y 4.7 – 7.9 mg/100g, respectivamente.<sup>55</sup>

Al comparar los contenidos de catequina y epicatequina de los dos estudios mencionados anteriormente con los del chocolate “Valle del Chanka”, podemos notar que dicho chocolate presenta contenido de catequina (1.9 mg/100g) cercano a los de los chocolates de Turquía, mientras que el contenido de epicatequina (25.2 mg/100g) se encuentra dentro del rango que tienen los chocolates oscuros de Serbia.

Se puede inferir que el tipo de cacao y procedencia juegan un rol importante en el contenido de dichos compuestos. Durante la elaboración del chocolate, procesos como el tostado y la alcalinización afectan también su contenido.<sup>55</sup>

Para evaluar la actividad antioxidante del chocolate “Valle del Chanka” se realizaron dos pruebas *in vitro*: DPPH Y ORAC.

El test de DPPH es un método colorimétrico cuya actividad se expresa como la concentración necesaria para neutralizar el 50% de los radicales DPPH, lo cual indica que a menor  $EC_{50}$  mejor será la actividad antioxidante.<sup>41</sup>

El chocolate “Valle del Chanka” presentó una mayor actividad antioxidante ( $EC_{50} = 0.3$  mg/mL) que el chocolate oscuro ( $EC_{50} = 0.4$  mg/mL) y de leche ( $EC_{50} = 6.7$  mg/mL) provenientes de la empresa Chocolat Stella SA de Suiza.<sup>56</sup> Asimismo, presentó una mayor potencia antioxidante que el vino tinto Malbec ( $EC_{50} = 42.27$  mg/mL).<sup>56</sup> Sin embargo, su potencia antioxidante es menor que la del ácido ascórbico ( $EC_{50} = 0.004$  mg/mL).

El test de ORAC mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger a la fluoresceína del daño oxidativo. Esta actividad se expresa como micromoles de trolox equivalente por gramo de chocolate ( $\mu\text{mol TE/g chocolate}$ ).<sup>44</sup>

Un estudio utilizó el método de ORAC para evaluar la actividad antioxidante de chocolates oscuros y de leche provenientes de Estados Unidos. La actividad

antioxidante del chocolate oscuro (1031.9  $\mu\text{mol TE/g}$ ) fue mayor que la del chocolate de leche (71.3  $\mu\text{mol TE/g}$ ).<sup>45</sup> Al compararlo con dicho estudio, el chocolate “Valle del Chanka” mostró mayor actividad antioxidante (823.5  $\mu\text{mol TE/g}$ ) que el chocolate de leche, pero menor que la del chocolate oscuro.

Las metilxantinas (teobromina y cafeína) se encuentran principalmente en el cacao y sus derivados como el chocolate, la teobromina se encuentra en mayor cantidad y es además una de las xantinas más importantes de la dieta debido a que mejora el estado de alerta sin inducir latidos cardiacos irregulares o hipertensión, tiene efecto diurético, relajante muscular bronquial, antitusivo y juega un rol importante en la disminución de la glucosa plasmática.<sup>57-60</sup>

Por otro lado, la teobromina tiene mayores efectos psico-farmacológicos debido a que su vida media plasmática es de 10 horas, mientras que la de la cafeína es de 5 horas.<sup>61</sup>

Estudios realizados en diversos chocolates oscuros de Serbia muestran que el contenido de teobromina (500 a 2200 mg/100 g) es mayor que el contenido de cafeína (30 -100 mg/100 g).<sup>47</sup>

El chocolate Valle del Chanka también reportó un contenido mayor de teobromina (524.1 mg/100g) que de cafeína (142.5 mg/100g). Asimismo, los valores obtenidos son bastante cercanos a los chocolates oscuros de Serbia. Sin embargo, el contenido de teobromina y cafeína puede variar de acuerdo al área geográfica, procesos como la fermentación en exceso y tipo de cacao con que se elaboró el chocolate.<sup>62</sup>

El secreto de la gran popularidad del aroma y sabor del chocolate se debe principalmente a sus compuestos volátiles, siendo este uno de los criterios más importantes para la evaluación de su calidad.<sup>12</sup>

Más de 600 compuestos volátiles componen la mezcla compleja que caracteriza el aroma de chocolate incluyendo aldehídos, pirazinas, ácidos, alcoholes, ésteres, cetonas, furanos, pirrol, fenoles, terpenos y alcoholes terpénicos; esta cantidad puede variar de acuerdo al genotipo del grano del cacao utilizado, condiciones de crecimiento y procesos de fabricación; este último puede contribuir y/o afectar el sabor del chocolate.<sup>63, 64.</sup>

Ciertos estudios indican que el compuesto que se encuentra con mayor frecuencia en el chocolate son las pirazinas. Efectivamente, en el chocolate “Valle del Chanka”

encontramos como compuesto mayoritario a un tipo de pirazina: 3,6-dimetilpirazina (40.7%), la cual contribuye en el aroma y sabor anuezado y a chocolate.<sup>65</sup> Este compuesto es producido por la Reaccion de Maillard durante el tostado de los granos de cacao. La reacción ocurre entre los azúcares reductores (glucosa y fructosa) y aminoácidos libres o péptidos de cadena corta.<sup>66</sup>

El ácido acético (30.7%) fue otro de los compuestos mayoritarios encontrados en el chocolate “Valle del Chanka”, lo cual se pudo dar debido a que el tiempo de conchado fue insuficiente. Por otro lado, estudios han demostrado que el ácido acético es uno de los compuestos dominantes en los granos de tipo de cacao criollo sin tostar, este compuesto incluso se puede conservar después del tueste.<sup>67</sup>

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos lotes para el análisis proximal (humedad, proteína, fibra y carbohidratos), polifenoles totales, catequina, epicatequina, metilxantinas y actividad antioxidante; aunque estas diferencias no serían importantes a nivel de producción.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que el chocolate “Valle del Chanka” contiene compuestos que pueden ser beneficiosos a la salud como: catequina, epicatequina, teobromina, cafeína y ácidos grasos cuyas concentraciones son similares al ser comparadas con otros chocolates encontrados en la literatura. El presente estudio contribuye con el conocimiento de las características nutricionales, contenido de metabolitos, actividad antioxidante y compuestos volátiles del chocolate “Valle del Chanka” al 72%. Los resultados sirven además de punto de partida para futuras investigaciones con miras a la optimización de la calidad químico-organoléptica de dicho chocolate.

## VII. CONCLUSIONES

- El chocolate “Valle del Chanka” presentó un alto contenido de grasa (53.2 - 53.6%) y Carbohidratos (34.8 - 35.1%).
- Los ácidos grasos mayoritarios en el chocolate “Valle del Chanka” son los saturados como el esteárico (39.8%) y palmítico (23.9 – 24.4%) e insaturados como el oleico (33.5% – 34.0%).
- El contenido de compuestos fenólicos totales en el chocolate “Valle del Chanka” fue de 678.5 -794.0 mg EAG/100 g chocolate.
- El contenido de epicatequina (23.9 - 26.4 mg/100 g) fue mayor que el contenido de catequina (1.6 – 2.2 mg/100 g) en el chocolate “Valle del Chanka”.
- La actividad antioxidante medida por el test de DPPH, expresada como EC<sub>50</sub> fue 0.2 - 0.3 mg/mL y en el test de ORAC fue 668.5 – 978.4 μmol equivalentes de Trolox/g chocolate.
- El contenido de teobromina (521.3 - 526.9 mg/100 g) fue mayor que el de cafeína (136.2 - 148.7 mg/100 g) en el chocolate “Valle del Chanka”.
- En el chocolate “Valle del Chanka” se detectaron 29 compuestos volátiles. Los compuestos mayoritarios fueron 3,6-dimetilpirazina (40.5 - 40.9%) y el ácido acético (30.5 - 30.9%).

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ENRIQUEZ GA. Cacao orgánico. Instituto Nacional Investigaciones Agropecuarias (INIAP). 2004.
2. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (MINCETUR). Ficha técnica del cacao en: [www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/cacao.pdf](http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/cacao.pdf)
3. HUNTER JR. The status of cacao (*Theobroma cacao*, Sterculioideae) in the Western hemisphere. *Econ. Bot.* 1990; 44(4): 425-439.
4. AMORES F., BUTLER D., RAMOS G., SUKHA D., ESPIN S., GOMEZ A., ZAMBRANO A., HOLLYWOOD N., VAN LOO R., SEGUINE E. Project to Determine the Physical, Chemical and Organoleptic Parameters to Differentiate Between Fine and Bulk Cocoa. Instituto Nacional Investigaciones Agropecuarias (INIAP), International Cocoa Organization (ICCO). Agosto 2007.
5. International Cocoa Organization (ICCO). Latest quarterly bulletin of cocoa statistics. Julio 2011
6. Centro de Comercio Internacional UNCTAD/GATT. Cacao fino o de aroma, estudio de la producción y el comercio mundial. Ginebra; 1991.
7. Javier Contreras. Diario La República. El Perú debe apostar por el cacao fino y de aroma para la exportación. Edición impresa: Octubre; 2015.
8. GÓMEZ-JUARISTI M., GONZÁLEZ-TORRES L., BRAVO L., VAQUERO M.P., BASTIDA S., SÁNCHEZ-MUNIZ F.J. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nut. Hosp.* 2011; 26(2):289-292.
9. LI Y., FENG Y., ZHU S., LUO C., MA J., ZHONG F. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *J. Food Comp. Anal.* 2012; 25:17-23.
10. Organización Internacional del cacao (ICCO), Instituto Nacional de investigaciones Agropecuarias. Study of the Chemical, Physical and Organoleptic Parameters to Establish the difference between Fine and Bulk Cocoa. Marzo 2011.  
Disponible en el siguiente enlace: <https://www.icco.org/projects/by-area-of-action/10-projects/144-study-the-chemical-physical-and-organoleptic-parameters-to-establish-the-difference-between-fine-and-bulk-cocoa.html>.
11. MURSU J., VOUTILAINEN S., NURMI T. Dark Chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit

- lipid peroxidation in healthy humans. *Free Rad. Biol. & Med.* 2004; 37(9):1351-1359.
12. DUCKI S., MIRALLES-GARCIA J., ZUMBÉ A., TORNERO A., STOREY D. Evaluation of solid phase micro extraction coupled to gas chromatography mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta* 2008; 74: 1166-1174.
  13. International Cocoa Organization (ICCO). Project: Cocoa productivity and quality improvement (Final Report). Junio; 2012.
  14. London Chocolate Week 2013. Disponible en el siguiente enlace: [www.internationalchocolateawards.com/2013/06/americas-semi-final-2013-grand-jury-finalists/](http://www.internationalchocolateawards.com/2013/06/americas-semi-final-2013-grand-jury-finalists/)
  15. Academy of chocolate 2015. Disponible en el siguiente enlace: [www.academyofchocolate.org.uk/awards/2015-2](http://www.academyofchocolate.org.uk/awards/2015-2)
  16. CHEESMAN EE. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Trop. Agric.* 1944; 21(8):144-159.
  17. MOTAMAYOR JC, RISTERUCCI AM, LOPEZ PA, ORTIZ CF, MORENO A, LANAUD C. Cacao domestication I. The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 2002; 89: 380-386.
  18. MOTAMAYOR JC, RISTERUCCI AM, HEATH M, LANAUD C. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitarians cacao cultivar. *Heredity* 2003; 91: 322– 330.
  19. PÉREZ JM. Manual de Aplicación de descriptores agromorfológicos para la identificación y registro de cultivares Salvadoreños de *Theobroma cacao*. 2009; 15: 35-36.
  20. SIMONEAU, C., HANNAERT, P., & ANKLAM, E. Detection and quantification of cocoa butter equivalents in chocolate model systems: analysis of triglyceride profiles by high resolution GC. *Food Chem.* 1999; 65:111-116.
  21. SALINAS N, BOLIVAR W. Ácidos grasos en chocolates venezolanos y sus análogos. *An. Venez. Nutr.* 2012; 25: 34-41.
  22. FRANK, D., PAT, S., ALLEN, V. Agilent Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters, Agilent Technologies, 2005
  23. NIEMENAK N., ROHSIUS C., ELWERS S., NDOUMOU D & LIEBEREI R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J. Food Comp. Anal.* 2006; 19 (6-7): 612-619.
  24. OTHMAN A., ISMAIL A., GHANI N & ADENAN L. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 2007; 100 (4): 1523-1530.

25. WOLLGAST J, ANKLAM E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Res. Int.* 2000; 33: 449-459.
26. TODOROVIC, V.; RADOJCIC, I.; TODOROVIC, Z.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M; SOBAJIC, S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolate produced in Serbia. *J. Food Comp. Anal.* 2015; 41:137-143.
27. NAIK JP. Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 3579-3583.
28. COUNET C & CALLEMIEN D. Use of gas chromatography–olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(8), 2385–2391.
29. LIU J, LIU M, HE C, SONG H, GUO J, WANG Y, YANG Y, YANG H, SU X. A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: relationship to sensory perception. *J. Sci. Food Agric.* 2015; 95, 1362-1371.
30. QUINTERO M.L., DÍAZ MORALES K.M. Mercado mundial del cacao. *Agroalimentaria.* 2008; 9(18).
31. OLIVER NIEBURG .Confectionary news. Top 20 chocolate consuming nations of 2012. Disponible en el siguiente enlace :  
[www.confectionerynews.com/Markets/Interactive-Map-Top-20-chocolate-consuming-nations-of-2012](http://www.confectionerynews.com/Markets/Interactive-Map-Top-20-chocolate-consuming-nations-of-2012).
32. Organización Internacional del cacao (ICCO). Resumen del proceso de transformación de granos de cacao en el chocolate ICCO. Disponible en el siguiente enlace: <http://www.icco.org/about-cocoa/processing-cocoa.html>.
33. RIGEL J. Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolates y sus subproductos. 2005. [http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/EI\\_Chocolate.pdf](http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/EI_Chocolate.pdf)
34. Official Methods of Analysis (AOAC). Cacao Beans and its Products. Preparation of laboratory sample procedure. Method 970.20.
35. Official Methods of Analysis (AOAC). Cacao Beans and its Products. Loss on Drying (moisture) in cacao products. Gravimetric Method. Method 931.04.
36. Official Methods of Analysis (AOAC). Cacao Beans and its Products. Ash of Cacao products. Ash of Cacao Products. Method 972.15.
37. FRANK, D., PAT, S., ALLEN, V. Agilent Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters, Agilent Technologies, 2005

38. PEREA-VILLAMIL J.A., CADENA-CALA T., HERRERA-ARDILA J. The cocoa and its products as antioxidant source: Processing effect. Rev. Univ. Ind. Santander. Salud .2009; 41(2): 128-134.
39. NARMIN YAZDIZADEH, RASHID JAMEI, REZA HEIDARI. Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L. varieties phenolic extracts and the effects of thermal treatment. Avicenna J. Phytomed. 2013; 3(1): 25-34.
40. NATSUME M, OSAKABE N, YAMAGISHI M, TAKIZAWA T, NAKAMURA T, MIYATAKE H, HATANO T, YOSHIDA T. Analysis of Polyphenols in Cacao Liquor, Cocoa and Chocolate by Normal-Phase and Reversed-Phase HPLC. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000; 64:2581-2587.
41. OTHMAN A, AMIN ISMAIL, NAWALYAH ABDUL GHANI, ILHAM ADENAN. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Food Chem. 2007;100: 1523–1530
42. BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E., BERSET C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT-Food Sci. Technol. 1995; 28(1):25-30
43. OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay using fluorescein as the fluorescent probe. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 4619-4626
44. RED CORNUCOPIA 2013. Determinación de la actividad antioxidante capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Disponible en elenlace:  
[www.redcornucopia.org/uploads/formacion/Documentos/5/138770967810Protocolo%20ORAC-%20RED%20CORNUCOPIA%202013.pdf](http://www.redcornucopia.org/uploads/formacion/Documentos/5/138770967810Protocolo%20ORAC-%20RED%20CORNUCOPIA%202013.pdf)
45. XIANLI WU, GARY R. BEECHER, JOANNE M. HOLDEN, DAVID B. HAYTOWITZ, SUSAN E. GEBHARDT, AND RONALD. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States J. Agric. Food Chem. 2004;52: 4026–4037
46. TODOROVIC, V.; RADOJCIC, I.; TODOROVIC, Z.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M; SOBAJIC, S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolate produced in Serbia. J. Food Comp. Anal. 2015; 41:137-143.
47. NAIK JP. Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 3579-3583.
48. RODRIGUEZ-CAMPOS J, ESCALONA-BUENDÍA HB, OROZCO-ÁVILA I, LUGO-CERVANTES E, JARIMILLO-FLORES E. Dynamics of volatile and non-

- volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res. Int.* 2011; 44(1): 250 – 258.
49. GIL-HERNANDEZ A. Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2da ed. México: Panamericana; 2001, 21(2): 32-33
  50. TORRES MORENO M, TORRES CASANA E, SALAS SALVADÓ J, BLANCH C. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chem.* 2015; 166, 125-132.
  51. RAFECAS M, CODONY R. Estudio nutricional del cacao y sus productos derivados, Instituto del cacao y chocolate, setiembre 2000.  
Disponibile en el siguiente enlace: <http://chocoki.com.br/site/artigos/5.pdf> .
  52. CLAPPERTON J, YOW S, CHAN J, LIM D, LOCKWOOD R, ROMANCZYK L., HAMMERSTONE J. The contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L) flavor. *Tropic. Agric. (Trinidad)*. 1992; 71: 303-308.
  53. COUNET C, OUWERX C, ROSOUX D, & COLLIN S. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 6243-6249.
  54. ŻYŻELEWICZ D, WIESŁAWA K, JOANNA O, SOSNOWSKA D, GRAŻYNA B, EWA N. The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. *Food Res. Int.* 2016; 50, 90-92.
  55. GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN M, BERKTAS I, ÖZCELIK B. Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.* 2016; 66, 252-259.
  56. FERNÁNDEZ GIUSTI A, MUÑOZ JÁUREGUI A, CAMBILLO MOYANO E, RAMOS ESCUDERO F, ORTIZ URETA C. Efecto del consumo moderado de vino tinto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular. *Acta Med. Per.* 2007; 24(3): 11-12.
  57. MITCHELL E, SLETTENAAR M, MEER N, TRANSLER C, JANS L, QUADT F, ET AL. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. *Physiol. & Behav.* 2011; 104, 816-822.
  58. DE SENA AR, APARECIDA DE ASSIS S & BRANCO A. Analysis of theobromine and related compounds by reversed phase High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection: an update. *Food Technol. Biotechnol.* 2011; 49, 413-423.

59. USMANI OS, BELVISI MG, PATEL HJ, CRISPINO N, BIRREL MA, KORBONITS M, ET AL. Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *FASEB J.* 2005; 19(2), 231- 233.
60. SARRIA B, MARTINEZ-LOPEZ S, FERNANDEZ-ESPINOSA A, GOMEZ-JURIASTI M, GOYA L, MATEOS R, ET AL. Effects of regularly consuming dietary fibre rich soluble cocoa products on bowel habits in healthy subjects: a free-living, two-stage, randomized, crossover, single blind intervention. *Nutr. Metab.* 2012; 9, 1-10.
61. TARKA SM, SHIVELY CA, Methylxanthines. *Toxicological Aspects of Food.* London, England: Elsevier; 1987: 383-423.
62. JOAN L., APGAR AND STANLEY M. TARKA, JR. Methylxanthine Composition and consumption patterns of cocoa and chocolate products. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1984; 7: 149-178.
63. COUNET C & CALLEMIEN D. Use of gas chromatography–olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(8), 2385–2391.
64. AFOAKWA EO, PATERSON A, FOWLER M & RYAN A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008; 48(9), 840–857.
65. OWUSU M, PETERSEN MA, HEIMDAL H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *J. Food Process. Preserv.* 2011; 1-11.
66. PORTILLO E, LABARCA M, GRAZZIANI L, CROS E, ASSEMAT S, DAVRIEUX F, BOULANGER R, MARCANO M. Formación del aroma del cacao Criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *Revista UDO Agrícola.* 2009; 9(2): 458-468.
67. FRAUENDORFER F., SCHIEBERLE P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(21), 10244–51.