

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



**Composición químico-nutricional, fenólicos, metilxantinas,
compuestos volátiles y actividad antioxidante de la cobertura
de chocolate “La Ibérica”**

JANNETT GERALDINE BOBADILLA JIMENEZ

Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico

Lima-Perú
2016

Miembros del Jurado

Dr. Abraham Vaisberg Wolach

Dr. José Aliaga Arauco

Bfga. Luz Marina Pacheco Lechuga

Asesora

MD, PhD Rosario Elena Rojas Durán

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres por brindarme su apoyo incondicional y consejos para realizarme como profesional y mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de alcanzar una de mis metas propuestas en la vida.

A la Dra. Rosario Rojas, asesora de tesis por su apoyo, paciencia, sabias enseñanzas, y sugerencias para la culminación de este trabajo.

A mis padres por su comprensión y apoyo en todo momento a pesar de las adversidades.

A MSc. Candy Ruiz, MSc. David Condori, PhD. Kirti Patel y a las personas de la Unidad de Investigación en Productos Naturales apoyándome en los diferentes análisis experimentales hechos en esta investigación y compartir sus conocimientos para así culminar con éxito esta tesis.

A los miembros del jurado de tesis, por brindarme su tiempo y sugerencias para la redacción de la tesis.

El presente trabajo de tesis recibió el financiamiento del Programa Nacional para la Competitividad y Productividad-Innovate Perú, de acuerdo al contrato 159-PNICP-PIAP-2015.

Lista de Figuras

Figura N° 1: Curva de calibración de teobromina.....	37
Figura N° 2: Curva de calibración de cafeína.....	38
Figura N° 3: Curva de calibración de ácido gálico.....	39
Figura N° 4: Curva de calibración de catequina.....	40
Figura N° 5: Curva de calibración de epicatequina.....	40
Figura N° 6: Concentración versus porcentaje inhibición de radicales DPPH para el ácido ascórbico.....	41
Figura N° 7: Curva de Calibración de Trolox.....	42

Lista de Tablas

Tabla N° 1 Análisis proximal de cobertura de chocolate.....	36
Tabla N° 2 Perfil de ácidos grasos de cobertura de chocolate.....	37
Tabla N° 3 Contenido de metilxantinas en cobertura de chocolate.....	38
Tabla N° 4 Contenido de compuestos fenólicos totales en cobertura de chocolate...	39
Tabla N° 5 Contenido de catequina y epicatequina en cobertura de chocolate.....	40
Tabla N° 6 Concentraciones efectivas medias en el test de DPPH.....	41
Tabla N° 7 Actividad antioxidante de muestras chocolate en el test de ORAC.....	42
Tabla N° 8 Compuestos volátiles de cobertura de chocolate.....	43

Abreviaturas

% : Porcentaje

°C : Grados Celsius

APPH: 2',2'-azobis-2-metilpropionamida

cm : Centímetros

DPPH : 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil

Etc. : Etcétera

g : Gramo

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

EC₅₀ : Concentración Efectiva Media

mg : Miligramo

mL : Mililitro

mm : Milímetros

mM : Milimolar

min : Minutos

nm : Nanómetros

N : Normalidad

pH : Potencial de Hidrógeno

µg : Microgramos

µL : Microlitros

UV : Ultravioleta

Trolox : ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8- tetrametilcromo-2-carboxílico

INDICE

Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción	11
II. Marco Teórico	13
2.1 Procesamiento de la calidad del grano.....	13
2.2 Obtención de los Nibs de cacao.....	13
2.3 Elaboración del chocolate.....	14
2.4 Chocolate.....	15
2.5 Tipos de chocolates.....	15
2.6 Nutracéutico.....	16
2.7 Propiedades del chocolate.....	16
2.7.1 Compuestos fenólicos.....	16
2.7.1.1 Flavonoides.....	16
2.7.1.1.1 Flavanoles.....	16
2.7.2 Metilxantinas.....	17
2.7.3 Compuestos volátiles.....	18
2.7.4 Ácidos grasos.....	19
III. Objetivos	20
3.1 General.....	20
3.2 Específicos.....	20
IV. Metodología	21
4.1 Obtención y tratamiento de la muestra.....	21
4.2 Análisis Proximal de la muestra.....	21
4.2.1 Prueba de Humedad.....	21
4.2.2 Determinación de Cenizas.....	21
4.2.3 Determinación de Proteínas (Método de Kjeldahl).....	22
4.2.4 Determinación de Grasas totales.....	23
4.2.5 Determinación de Fibras totales.....	23
4.2.6 Determinación del Porcentaje de Carbohidratos.....	24
4.3 Determinación del Perfil de ácidos Grasos.....	24
4.4 Determinación de Teobromina y Cafeína.....	25
4.5 Determinación de concentración de Compuestos Fenólicos.....	27
4.6 Determinación de Catequina y Epicatequina.....	28
4.7 Actividad Antioxidante.....	30
4.7.1 Test de DPPH.....	30

4.7.2	Test ORAC.....	32
4.8	Determinación de Compuestos Volátiles.....	34
4.9	Análisis estadístico	35
V.	Resultados	36
5.1	Análisis Proximal de la muestra.....	36
5.2	Determinación del Perfil de ácidos Grasos.....	36
5.3	Determinación de Teobromina y Cafeína.....	37
5.4	Determinación de concentración de Compuestos Fenólicos.....	38
5.5	Determinación de Catequina y Epicatequina.....	39
5.6	Actividad Antioxidante.....	41
5.6.1	Test de DPPH.....	41
5.6.2	Test ORAC.....	42
5.7	Determinación de Compuestos Volátiles.....	42
VI.	Discusión	44
VII.	Conclusiones	49
VIII.	Referencias Bibliográficas	50

RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) y sus productos derivados como el chocolate, son los alimentos con reconocidas propiedades beneficiosas para la salud, principalmente asociado a su alto contenido de polifenoles y otros compuestos bioactivos

En el Perú existen diversas empresas dedicadas a la fabricación de productos a partir del cacao peruano. Así tenemos por ejemplo a “La Ibérica”, una empresa arequipeña con más de 100 años de reconocida trayectoria.

El objetivo de este estudio fue analizar la cobertura de chocolate al 52% de La Ibérica, la cual es importante para la fabricación de diversos chocolates, con miras a conocer su potencial nutricional y de contenido de compuestos beneficiosos a la salud.

Todos los análisis fueron realizados en 2 lotes de producción. El análisis proximal de la cobertura de chocolate La Ibérica dio como resultado un alto contenido de Carbohidratos (53.9-57.8%), Grasa (31.6-32.7%) y proteínas (6.5-6.6%).

El perfil de ácidos grasos, obtenido por cromatografía de gases, mostró la presencia mayoritaria del ácido palmítico (26.5-26.8%), esteárico (32.0-32.4%) y oleico (37.6-38.3%).

La concentración de teobromina (394.9-408.9 mg/100 g chocolate), determinada por cromatografía HPLC, fue 2.4 veces mayor que la de cafeína (172.9-174.5 mg/100 g chocolate).

El contenido de compuestos fenólicos totales, determinado por método espectrofotométrico, fue de 1.5%.

La concentración de epicatequina, medida por cromatografía HPLC, fue 1.9 veces mayor que la de catequina (63.7-64.7 y 34.2-34.8 mg/100 g chocolate, respectivamente).

La actividad antioxidante en el test de DPPH, expresada como concentración efectiva media, fue de 0.146-0.142 mg/ml. Mientras que la actividad en el test de ORAC fue 489.07-477.21 μ mol equivalentes de Trolox/g chocolate.

Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se lograron detectar 33 compuestos volátiles. Los compuestos mayoritarios fueron el ácido acético (57.23%), acetato de etilo (11.67%) y estireno (4.26%).

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) and its derived products such as chocolate, are foods with recognized beneficial health properties, mainly associated with its high content of polyphenols and other bioactive compounds.

In Peru there are several companies engaged in the manufacture of products from Peruvian cacao. There is for example "La Ibérica", a Peruvian Company located in Arequipa, with over 100 years of recognized experience.

The aim of this study was to analyze the chocolate (52%) of La Iberica, which is important for the manufacture of other chocolate derived products, in order to assess their nutritional potential and content of health beneficial compounds.

All analyses were performed on two consecutive production batches. Proximate analysis of chocolate from La Ibérica showed high carbohydrate (53.9-57.8%), fat (31.6-32.7%) and protein (6.5-6.6%) contents.

The fatty acid profile, obtained by gas chromatography, showed mainly the presence of palmitic (26.5-26.8%), stearic (32.0-32.4%) and oleic (37.6-38.3%) acids.

The concentration of theobromine (394.9-408.9 mg/100 g chocolate), determined by HPLC, was 2.4 times greater than caffeine (172.9-174.5 mg/100 g chocolate).

The content of total phenolic compounds, as determined by spectrophotometric method, was 1.5%. The epicatechin concentration, measured by HPLC, was 1.9 times greater than catechin (63.7-64.7 and 34.2-34.8 mg/100 g chocolate, respectively).

The antioxidant activity in the DPPH test, expressed as median effective concentration, was 0.142-0.146 mg/ml. Antioxidant activity in the ORAC test was 477.21-489.07 μ mol Trolox equivalents/g chocolate.

A total of 33 volatile compounds were detected by gas chromatography-mass spectrometry. The mayor compounds were acetic acid (57.23%), ethylacetate (11.67%) and styrene (4.26%).

I. INTRODUCCIÓN

La investigación en el campo nutricional se ha centrado en las últimas décadas en una dieta bioactiva como por ejemplo una dieta rica en flavonoides, éstos son bioactivos que se encuentran en muchos alimentos y bebidas, ya que poseen propiedades beneficiosas para la salud humana.¹

El cacao (*Theobroma cacao* L.) y sus productos derivados como el chocolate, son los alimentos más prometedores debido a sus propiedades beneficiosas para la salud brindado por su alto contenido de polifenoles y otros bioactivos, por ello son considerados como productos alimenticios bio-funcionales.^{1,2} Los principales ingredientes nutricionales del grano de cacao son la grasa, carbohidratos, proteínas y minerales; además contiene diferentes compuestos biológicos activos con diversas actividades en el cuerpo humano como por ejemplo las xantinas (cafeína y teobromina, ambos poseen actividad psico-farmacológica) y compuestos polifenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides como potentes antioxidantes).³ Por ejemplo, el consumo de flavonoides del cacao puede mejorar aspectos de la función cognitiva a través de la actividad neuronal mejorada, mejora el rendimiento visual y el flujo sanguíneo cerebral; asimismo, el consumo de flavonoles reduce el riesgo de enfermedad coronaria.^{2,4}

Todo lo mencionado anteriormente genera un interés por la composición nutricional de los productos derivados del cacao como es el chocolate, ya que la literatura menciona que éste posee efectos beneficiosos para el organismo a través de la dieta y también en la prevención de enfermedades; por ello, el chocolate es considerado como un “nutracéutico”.⁵ Es considerado así porque es un alimento con alto poder energético, rico en nutrientes y en minerales, además posee compuestos polifenólicos también conocidos como flavan-3-oles o catequinas y procianidinas; ciertos estudios han demostrado que el consumo de polifenoles en el chocolate conducen a mejoras significativas en la salud cardiovascular a largo plazo como: la presión arterial, el tono vascular, la función endotelial, la resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa, la reactividad de las plaquetas y el sistema de defensa inmune y antioxidante.^{2,6,7}

El cacao, principal componente del chocolate, es rico en metilxantinas como son la teobromina y la cafeína; estos alcaloides son farmacológicamente activos y tienen la capacidad fisiológica para modular el sistema nervioso central.^{2,8} Los alcaloides actúan como vasodilatadores y poseen propiedades tonificantes y antineurálgicas.⁹

En el Perú existen diversas empresas dedicadas a la fabricación de productos asociados a la gastronomía, pastelería, confitería, salud y cosmética; a partir del cacao peruano.¹⁰ Una de ellas es “La Ibérica”, empresa arequipeña reconocida como una de las marcas más destacadas del rubro de chocolatero a nivel nacional. Produce chocolates, toffees, mazapanes y turrones.¹¹

Uno de los productos de gran importancia para la fabricación de diversos chocolates y pasteles es la cobertura de chocolate ya que es la materia prima para la elaboración de ellos.¹² No existen estudios previos sobre la composición nutricional, actividad antioxidante y compuestos volátiles de la cobertura de chocolate que fabrica la empresa La Ibérica. El objetivo de este estudio es analizar dicho ingrediente, que es clave para la fabricación de diversos chocolates, con miras a conocer su potencial nutricional y, de acuerdo a los resultados obtenidos, darle más valor comercial.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Procesamiento del grano de cacao

- *Proceso de Cosecha:*
 - Este proceso comprende el recojo de las mazorcas o frutos maduros identificados por una coloración particular amarilla o rojo pálido. Se extraen las mazorcas (bellotas) una vez maduras mediante una tijera de podar. Cada mazorca se abre delicadamente en dos con un machete para no dañar los granos (almendras o semillas), los cuales deben ser colocados en sacos de polipropileno y estar libres de impurezas con el fin de no dañar la calidad del grano.¹³

- *Proceso de Fermentación:*
 - Este proceso tiene como objetivo desprender los granos del mucílago, generar varias reacciones bioquímicas por la colonización de tipo microbiana, el cambio de color de violeta a marrón y el desarrollo de los precursores del sabor y aroma del chocolate. La duración de este proceso varía de 4 a 8 días dependiendo de la zona climática, la variedad de cacao y de las dos fases de fermentación (anaeróbica y aeróbica).^{9,14,15}

- *Proceso de secado:*
 - El objetivo de este proceso es eliminar la humedad de los granos fermentados desde un 75% hasta un 7% o menos, con el fin de asegurar que el cacao tenga buenas condiciones de conservación. La duración de este proceso es de 5 a 6 días.^{13,14}

2.2 Obtención de los Nibs de cacao

Los nibs de cacao se consiguen a partir de los granos de cacao, por ello tiene que seguir por los siguientes procesos:

1. Descascarillado:
 - Los granos deben ser seleccionados cuidadosamente y limpiados para eliminar piedras, palillos y suciedad. Luego se utiliza un pelador para separar las cáscaras de los nibs de cacao limpio, para luego ser tostados.¹⁶

2. Tostado:

- Este proceso es usado para remover la humedad del grano de cacao y enriquece los sabores del cacao. Las condiciones de tostado son de 15 a 30 minutos a una temperatura de 100 - 130 °C, aunque puede ser tostado de diferentes maneras usando el calor intenso o calor moderado por corto o largo tiempo respectivamente, con el fin de obtener diferentes aromas y sabores.¹⁷

3. Molienda y prensado:

Luego de la molienda de los granos de cacao tostados (nibs) se obtiene la pasta de cacao. El prensado de esta pasta permite obtener el polvo de cacao y la manteca de cacao. El polvo de cacao es usado en panificadoras y la manteca en diversos tipos de chocolate (chocolate blanco, chocolate de leche y chocolate bitter o dark chocolate); también es utilizada en la industria farmacéutica y alimentaria. Cuando la pasta de cacao se encuentra en estado líquido se llama Licor de cacao, cuando se bate el licor las partículas se vuelven más pequeñas y adquirirá una textura suave. El licor de cacao se usa para la elaboración de chocolates.^{17,18}

2.3 Elaboración del chocolate

La manteca de cacao y licor de cacao pasan por los procesos de: amasado, refinado, conchado y temperado para la elaboración de chocolate.

- Amasado: en esta etapa se combina el licor de cacao, manteca de cacao, y azúcar; además pueden adicionarse leche, aromatizantes, emulsionantes (lecitina), espesantes, etc.
- Refinado: en esta etapa se disminuye el tamaño de partícula de la masa con ayuda de rodillos, obteniendo así una pasta suave.
- Conchado: en esta etapa se termina de eliminar restos de ácido acético y se mejora el sabor y textura del chocolate mediante el amasado de la pasta que puede durar unas horas a días.
- Atemporado: en esta etapa se calienta la mezcla y se enfría a temperaturas adecuadas con el fin de que la manteca de cacao forme un tipo de cristal especial y específico para que el chocolate quede lustroso.
- Moldeado y extracción: en esta etapa se debe verter el líquido viscoso en moldes, enfriándolo y formando tabletas de chocolate.^{17,19,20}

2.4 Chocolate

El chocolate se obtiene por un proceso de fabricación a partir de materias de cacao que pueden combinarse con productos lácteos, azúcares y/o edulcorantes y otros aditivos. Para constituir los distintos productos de chocolate pueden añadirse otros productos alimenticios comestibles. Según CODEX, el chocolate deberá contener no menos del 20 % de extracto seco total de cacao.²¹

2.5 Tipos de chocolates

Existen diferentes tipos de chocolate según su composición, los cuales se pueden resumir en la siguiente tabla, donde el extracto seco de leche se refiere a la adición de ingredientes lácteos.²¹

Productos	Componentes (%)						
	Manteca de cacao	Extracto seco magro de cacao	Total de extracto o seco de cacao	Materia grasa de la leche	Total de extracto seco magro de la leche	Almidón/Harina	Avellanas
2.2 Tipos de Chocolate (Composición)							
2.2.1 Chocolate	≥18	≥14	≥35				
2.2.1.1 Chocolate a la taza	≥18	≥14	≥35			<8	
2.2.2 Chocolate dulce/familiar	≥18	≥12	≥30				
2.2.2.1 Chocolate familiar a la taza	≥18	≥12	≥30			<18	
2.2.3 Chocolate de cobertura	≥31	≥2.5	≥35				
2.2.4 Chocolate con leche		≥2.5	≥25	2.5-3.5	12-14		
2.2.5 Chocolate con leche familiar		≥2.5	≥20	≥5	≥20		
2.2.6 Chocolate de cobertura con leche		≥2.5	≥25	≥3.5	≥14		
2.2.7 Otros productos de chocolate							
2.2.7.1 Chocolate blanco	≥20			2.5-3.5	≥14		
2.2.7.2 Chocolate Gianduja		≥8	≥32				≥20 ≤40
2.2.7.3 Chocolate Gianduja con leche		≥2.5	≥25	2.5-3.5	≥10		≥15 ≤40
2.2.7.4 Chocolate para mesa							
2.2.7.4.1 Chocolate para mesa	≥11	≥9	≥20				
2.2.7.4.2 Chocolate semiamargo para mesa	≥15	≥14	≥30				
2.2.7.4.3 Chocolate amargo para mesa	≥22	≥18	≥40				

2.6 Nutracéutico

El término nutracéutico se refiere a que posee sustancias químicas o biológicas activas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los mismos, además tiene la capacidad de fortalecer la salud, cuidándolo y manteniéndolo, también en la prevención de enfermedades y en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo.²²

El chocolate es considerado como nutracéutico por poseer compuestos beneficiosos en la prevención de enfermedades y mejora de las funciones fisiológicas del organismo.⁷

2.7 Propiedades del chocolate

El chocolate posee en su composición compuestos antioxidantes, compuestos fenólicos (flavonoides), fibra dietética, ácidos grasos, entre otros.²²

2.7.1 Compuestos Fenólicos

2.7.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de polifenoles de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de 15 átomos de carbono ordenado en 3 anillos ($C_6-C_3-C_6$), cada uno etiquetado como A, B y C. La presencia de un doble enlace sirve para la clasificación de las diferentes subclases o subgrupos, del cual la sustitución del anillo A y B por grupos hidroxilo distinguen dichos miembros. Los principales subgrupos de estos compuestos son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles.²³

2.7.1.1.1 Flavanoles

Son estructuras que poseen un anillo saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C_3 . Los más representativos son los del tipo flavan-3-ol, al estar como monómeros son conocidos como catequinas. Las catequinas incluye a la (-)-epicatequina y la (+)-catequina, estas se encuentran en el chocolate como componente mayoritario bioactivo.²³

Los flavonoides presentes en el chocolate poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios, apoptóticos, antiapoptóticos, antilipémicos y antiaterogénicos.²⁴

Los métodos *in vitro* utilizados para la determinación de capacidad antioxidante en el chocolate son: la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y la captación de radicales DPPH[•].

- ORAC mide la degradación oxidativa de la fluoresceína luego que se le ha adicionado compuestos generadores de radicales libres por descomposición térmica de los llamados azo-iniciadores, como el APPH (2',2'-azobis-2-metilpropionamida) que produce radicales peroxilo. Los radicales generados por estos iniciadores producen un daño en la fluoresceína, cuyo resultado es la pérdida de la fluorescencia. Los antioxidantes de una muestra protegen a la fluoresceína de la degradación oxidativa, el grado de protección es cuantificado usando un Fluorómetro.²⁴
- DPPH se basa en la reducción de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en una solución alcohólica en presencia de un antioxidante donador de hidrogeno debido a la formación de la forma no radical (DPPH-H) en la reacción. Este método mide la capacidad reductora de los antioxidantes de una muestra hacia el DPPH[•], generando un color amarillo. Este análisis es simple, rápido y sólo se necesita un Espectrofotómetro UV-VIS.^{24,25}

Un método para la cuantificación e identificación de flavan-3-oles (catequina y epicatequina) en muestras de cacao y chocolate, es la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés), ya que tiene alta reproducibilidad.²⁶

El método de Folin-Ciocalteu es usado para determinar el contenido de fenólicos totales y es más sensible a la reducción de fenoles. Utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu y una solución de Na₂CO₃ al 7.5%. La coloración azul producida posee una absorción máxima a 750 nm la cual es medida por el Espectrofotométrico UV-VIS; esta es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos.²⁷

2.7.2 Metilxantinas

Las xantinas son derivados purinérgicos formados por los heterociclos pirimidina e imidazol condensados dando lugar a las metilxantinas que son la cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina) y teobromina (3,7-dimetilxantina).

La cafeína y teobromina son estimulantes del sistema nervioso central (SNC), a concentraciones normales pueden producir una mejora del rendimiento mental, físico, reducir el cansancio y el sueño; pero a mayores concentraciones pueden generar ansiedad, disforia. El potencial efecto psicológico procede principalmente de la teobromina y una pequeña contribución de la cafeína; en cuanto a la fisiología, la cafeína aumenta la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la diuresis.²⁸

La cantidad de metilxantinas varía de acuerdo a los diferentes tipos de chocolate, y cuyo ratio de teobromina/cafeína dependen del origen del grano de cacao, proceso de fabricación y formulación del chocolate.²⁹

Los alcaloides son cuantificados por diferentes técnicas como Espectrofotometría y HPLC, ésta última es eficiente, sensitiva y específica, además de cuantificar los alcaloides en una sola corrida de manera efectiva eliminando pigmentos de interferencia de la muestra a través de un cartucho o filtro Sep-Pak C18, ello hace que este método sea rápido y reproducible para el análisis de teobromina y cafeína en una muestra de cacao y chocolate.³⁰

2.7.3 Compuestos volátiles

El chocolate presenta sabores y olores característicos que son determinados por los granos de cacao durante el proceso de fermentación y secado. Los precursores del aroma en los granos de cacao son aminoácidos libres, péptidos y azúcares reductores desarrollados en el proceso de tostado a través de las reacciones de Maillard. La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) es usada para la detección e identificación de compuestos volátiles específicos.³¹

Los compuestos volátiles presente en el chocolate incluyen a grupos aldehídos, pirazinas, ácidos, alcoholes, esterés, cetonas, furanos, pirroles, fenoles, terpenos y terepen-alcoholes. En proceso de secado, los compuestos identificados en el chocolate oscuro son: nonanal, ácido acético, tetrametil-pirazina, benzaldehído, 2-metil-heptadecano y *n*-octano.^{32,33}

Los compuestos volátiles pueden ser detectados mediante la técnica de Micro-extracción en Fase Sólida (SPME) que se da en dos pasos, el primero es la extracción de los analitos de la muestra utilizando una fibra de sílice por un tiempo y temperatura determinada; el segundo paso es llevar dicha fibra al Cromatógrafo de Gases acoplado

a Espectrometría de Masas (GC-MS) y/o a Detector de Ionización a la Llama (FID) para la inyección de la muestras para que sufran el fenómeno de desorción que es cuando los compuestos volátiles son volatilizados a altas temperaturas y pueden diferenciarse e identificarse mediante una librería de espectros.³¹

2.7.4 Ácidos grasos

Los triglicéridos de ácidos grasos son el ácido oleico, esteárico y palmítico que se encuentran en el cacao. Algunos chocolates pueden contener aditivos que afectan la composición de ácidos grasos. Por lo que los ácidos grasos *trans* (AGT) pueden generar efectos negativos sobre la salud del ser humano al consumirlos.³⁴ Los AGT son ácidos grasos de tipo insaturados que tienen al menos un enlace doble en los átomos de carbono, cada uno con un átomo de hidrógeno, y con configuración *cis* o *trans*. Los más frecuentes son los monoinsaturados, pero también pueden encontrarse isómeros di-insaturados con configuraciones *cis*, *trans* o *trans*, *cis* e incluso isómeros triinsaturados.³⁵

El chocolate posee ácidos grasos saturados como el esteárico y palmítico, e insaturados como el oleico.⁷ Por ello, la diversidad de los ácidos grasos puede ser identificada y cuantificada por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrómetro de Masas (GC-MS) y/o con un detector de ionización a la llama (FID)³⁴ usando una columna DB-WAX que contiene polietilenglicol, la cual permite la separación de los ácidos grasos de acuerdo al número de carbonos y el grado de insaturación.³⁶

III. OBJETIVOS

3.1 General

Conocer la composición nutricional, perfil de ácidos grasos, contenido de compuestos fenólicos totales, metilxantinas, composición de compuestos volátiles y actividad antioxidante de la cobertura de chocolate “La Ibérica”.

3.2 Específicos

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

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

IV. METODOLOGÍA

4.1 Obtención y tratamiento de la muestra

Las muestras de cobertura de chocolate al 57% fueron suministradas por la empresa La Ibérica, codificadas con códigos “Lote 58” y “Lote 59” (02/12/2015).

4.2 Análisis Proximal de la muestra

4.2.1 Prueba de Humedad

Se encendió el equipo de humedad (Sartorius Moisture Analyzer - Modelo MA35) y a continuación se programó a 135 °C por 6 minutos. Se pesó aproximadamente 2 g de muestra de cobertura de chocolate en el platillo previamente tarado, luego se anotó el valor pesado. Posteriormente se anotó luego de los 6 minutos el peso final y el porcentaje de humedad brindada por el equipo.³⁷ Este análisis se realizó por triplicado para cada lote.

4.2.2 Determinación de Cenizas

Se pesó 0.5 g de muestra original de la muestra en un crisol previamente pesado, que luego fue colocado en la mufla (Thermo Scientific™ - Modelo FB1310M) a 525 °C por 3 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó que el contenido del crisol sea sólo cenizas (color blanquecino) para posteriormente colocarlo en el desecador durante 30 min, con el fin de obtener un peso constante; por último se tomó la medición del peso del crisol y se halló el porcentaje de cenizas.³⁸ Este análisis fue realizado por triplicado para cada lote.

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \left(\frac{P_{cm} - P_c}{P_m} \right) \times 100$$

Donde:

- P_{cm} : Peso en gramos del crisol más ceniza.
- P_c : Peso en gramos del crisol vacío.
- P_m : Peso en gramos de la muestra

4.2.3 Determinación de Proteínas (Método de Kjeldahl)

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Kjeldahl que consta de 3 etapas: digestión, destilación y titulación. Éste análisis fue realizado por triplicado para cada lote.

- Digestión: Se pesó aproximadamente 1 g de muestra de chocolate y se vertió en los balones de Kjeldahl, a continuación se adicionó 4 g de la mezcla de sulfato de sodio y sulfato de cobre ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$) en proporción de 9:1, y se agregó 14 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (98%). Se encendió y programó el proceso de digestión en el equipo digestor (VELP SCIENTIFICA Unidad de Digestión Kjeldahl DK8). Las muestras fueron calentadas en el equipo por un periodo de 1 hora a una temperatura de 450 °C. El fin de esta etapa fue determinado por la aparición del color celeste en los balones de Kjeldahl.
- Destilación: Para la destilación, se utilizó matraces de 250 mL a los cuales se les agregó 40 mL de ácido bórico al 4% y 3-5 gotas de indicador verde de bromocresol. Se colocó el balón de Kjeldahl (frío) en el equipo destilador (VELP SCIENTIFICA Unidad de Destilación Kjeldahl UDK 129) por 5 min, el cual consume 40 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 50% y 150 mL de Agua Ultrapura Tipo I; terminado dicho tiempo se obtuvo una solución azul intensa en los matraces y en los balones de Kjeldahl una solución de color negro que luego fue descartada.
- Titulación: Previamente se estandarizó la solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1N con 0.06 g de tris y 3-5 gotas del indicador de verde bromocresol. La solución de HCl 0.1 N contenida en una bureta, se utilizó para titular las soluciones contenidas en los matraces de las muestras, así como el blanco, hasta el viraje de color azul a amarillo intenso.

Los gastos del blanco y las muestras fueron anotados para el cálculo del porcentaje de proteína.³⁸

Cálculos:

$$\% \text{ Proteínas} = \left(\frac{14 \times (Vm - Vb) \times N \times Fp}{Pm} \right)$$

Donde:

- *Vm*: Volumen gastado en mililitros de HCl de la muestra
- *Vb*: Volumen gastado en mililitros de HCl del blanco
- *N*: Normalidad del HCl

- *Fp*: Factor proteico 6.25
- *Pm*: Peso en gramos de la muestra

4.2.4 Determinación de Grasas totales

La determinación de grasas totales se realizó por el método de Soxhlet. Este análisis fue realizado por triplicado para cada lote.

Se pesó aproximadamente 2 g de muestra original de la muestra en cartuchos de papel filtro, previamente preparados, y se los colocó dentro del Soxhlet. Se anotó los pesos de los balones vacíos y luego se adicionó 90 mL de éter de petróleo. Se conectó al sistema Soxhlet y se aseguró que este esté herméticamente cerrado, luego se circuló agua fría a flujo constante por el condensador y se prendió las cocinillas a temperatura media; todo esto bajo una campana de extracción. Este proceso tuvo una duración de 4 horas.

Al finalizar el tiempo estimado, se tomó los balones y se los llevó al rotavapor para eliminar el solvente hasta sequedad completa. Después, se llevó los balones a la estufa a 100 °C por 30 min y en seguida se los colocó al desecador. A continuación, se pesó cada balón y se determinó el porcentaje de grasa.³⁸

Cálculos:

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

Donde:

- *PBm*: Peso en gramos de balón con muestra
- *PBv*: Peso en gramos del balón vacío
- *Pm*: *Peso en gramos de la muestra*

4.2.5 Determinación de Fibras totales

Se pesó en un beaker de 250 mL alrededor de 0.5 g de la muestra desengrasada y se agregó 200 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 1.25% (hidrólisis ácida). Se dejó hervir por 30 minutos con ayuda de una cocinilla, se procuró que no se forme espuma con la ayuda de una bagueta. Se tomó en cuenta que toda la muestra estuviera en contacto con la solución. Terminado los 30 minutos, se procedió a preparar el equipo de succión (bomba de vacío, matraz Kitasato y embudo Büchner), se vació inmediatamente el contenido del vaso sobre el papel filtro colocado dentro del embudo Büchner y se lavó el residuo con 25 mL de H₂SO₄ al 1.25 % y con 3 porciones de 50 mL de agua destilada caliente. Previo

a ello, en otros vasos de precipitados se calentó hidróxido de sodio (NaOH) al 1.25%. Después del lavado, el papel filtro con la muestra se llevó al vaso de precipitado con NaOH al 1.25 % caliente, y con ayuda de una bagueta se eliminó todo el residuo del papel filtro. Se hirvió la muestra por 30 minutos. Pasado ese tiempo, se procedió a utilizar el equipo de succión colocando el papel filtro (previamente pesado) en el embudo Büchner para el lavado de la muestra con 25 mL de NaOH al 1.25% con 3 porciones de 50 mL de agua destilada y 25 mL de alcohol etílico. Luego del lavado, se procedió a dejar secar el papel filtro por 2 horas a 130 °C en la estufa y luego se dejó a enfriar en el desecador. Finalmente se tomó el peso y se determinó el porcentaje de fibra cruda.³⁸

Cálculos:

$$\% \text{ Fibras} = \left(\frac{PFm - PFv}{Pm} \right) \times 100$$

Donde:

- *Pcm*: Peso en gramos del papel filtro más muestra
- *Pc*: Peso en gramos del papel filtro vacío
- *Pm*: Peso en gramos de la muestra

4.2.6 Determinación del Porcentaje de Carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos se calculó por diferencia, partiendo de los 100 g de muestra y tomando en cuenta los otros componentes de la muestra como porcentajes: humedad, grasas, fibras, proteínas y cenizas.³⁹ El resultado final fue reportado como porcentaje de carbohidratos.

Cálculo:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\% \text{ Grasas} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ Fibras} + \% \text{ Cenizas})$$

4.3 Determinación del Perfil de Ácidos Grasos

Se determinó el perfil de ácidos grasos contenidos en la muestra de chocolate por el análisis del Cromatógrafo de gases acoplado a detector de Espectrometría de Masas (GC-MS), según el procedimiento descrito por Frank et al.³⁶

Este análisis fue realizado por duplicado para cada lote. Se inició con la derivatización por metilación, se pesó aproximadamente 100 mg de grasa en un tubo Falcon de 14 mL, luego se agregó 10 mL de *n*-pentano para la disolución de la muestra; se adicionó

100 µL de hidróxido de potasio (KOH) 2N en metanol. Se agitó el tubo Falcon en un vortex por 1 min y luego se llevó a la centrifuga por 6 min a 5000 rpm a 10 °C.

Se transfirió 1.5 mL del sobrenadante a viales para HPLC a través de un filtro Phenomenex 0.45 µm y con ayuda de una jeringa de tuberculina. Posteriormente, se llevó el vial para la inyección en el GC-MS e identificación de los ácidos grasos de la muestra problema.³⁶

Se utilizó un GC-MS (Agilent Technologies 7890 A – 5975C) con helio como gas portador y una columna DB-5MS (60 m x 250 µm x 0.25 µm), temperatura de inyección 250 °C, temperatura del detector MS 230 °C, ratio 200:1 y un tiempo de corrida total de 36 minutos. La columna se mantuvo a 100 °C durante 1 min, luego la temperatura aumentó 20 °C/min hasta 190 °C donde se mantuvo por 1 min, siguió aumentando la temperatura a 3 °C/min hasta 210 °C donde se mantuvo por 1 min y a continuación se incrementó a 1°C/min hasta la temperatura final de 230 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 5 µL. La identificación de los compuestos fue llevada a cabo a través de la comparación de los espectros de masas de los ácidos grasos con los espectros de masas brindados por la librería NIST 08 y FLAVOR 02.

4.4 Determinación de Teobromina y Cafeína

Para la determinación de teobromina y cafeína, se preparó una solución de referencia para cada una con una concentración de a 0.15 mg/mL y 0.1 mg/mL respectivamente.

Preparación de Curva de calibración:

Se pesó 1.5 mg de teobromina y 1 mg de cafeína, se llevó a volumen con Agua Ultrapura Tipo I en una fiola de 10 mL (solución stock). De la solución stock se hizo 5 diluciones para la elaboración de la curva de calibración.

Preparación de la muestra:

Este análisis fue realizado por duplicado para cada lote. Se pesó 0.2 g de muestra desengrasada de chocolate y se colocó en un balón, luego se agregó 40 mL de Agua Ultrapura Tipo I y se hizo reflujar por 30 minutos. Se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm y se llevó a volumen con Agua Ultrapura Tipo I en una fiola de 50 mL. A continuación, se colocó 2 mL de la solución acuosa dentro del filtro Sep-pak C18, previamente acondicionado.

- ◆ Acondicionamiento: En el filtro Sep- pak C18 se pesó 500 mg de empaque, se añadió 2 mL de metanol y luego con 5 mL de Agua Ultrapura Tipo I.

Después se colectó en un balón el líquido filtrado, que previamente se había eluído con 10 mL de cloroformo. Luego se evaporó el solvente, el residuo se re-disolvió con 5 mL de Agua Ultrapura Tipo I. Se transfirió 1.5 mL del sobrenadante y se traspasó a viales para HPLC a través de un filtro Phenomenex 0.45 µm y con ayuda de una jeringa de tuberculina. Posteriormente, se llevó el vial para la inyección en el HPLC.³⁰

• Condiciones cromatográficas:

- Columna: RP-18e (LiChroCART® 250-4)
- Fase móvil: Agua – Acetonitrilo (8:2)

Gradiente:

Tiempo (min)	Agua Ultrapura Tipo I (µL)	ACN (µL)
0	90	10
3	90	10
5	80	20
9	80	20
11	90	10
13	90	10

- Tiempo de análisis : 14 min
- Flujo : 1 mL/ min
- Longitud de onda : 276 nm
- Temperatura: 25 °C
- Volumen de inyección de muestra: 20 µL

Luego se determinó el contenido de teobromina y cafeína en la muestra de chocolate cuyos resultados fueron expresados en mg de teobromina o cafeína/100 g de muestra chocolate.

Cálculos:

$$\text{Concentración } \mu\text{g/mL} = \frac{\text{Área de muestra } \pm b}{a}$$

Donde:

Ecuación de la curva de calibración es: $y = a x \pm b$

$$\mu\text{g de teobromina o cafeína /g muestra desengrasada} = \frac{(\text{Concentración } \mu\text{g/mL} \times 5 \times 50)}{(\text{Peso muestra en gramos} \times 2)}$$

Los resultados fueron expresados en mg de teobromina o cafeína/100 g de muestra de chocolate.

$$\frac{\text{mg teobromina o cafeína} / 100 \text{ g de muestra de chocolate}}{1000} = \left(\frac{(\mu\text{g de teobromina o cafeína} / \text{g muestra desengrasada}) \times \% \text{ Desengrasado}}{1000} \right)$$

Donde:

$$\% \text{ Desengrasado} = 100 - \% \text{ grasa}$$

4.5 Determinación de compuestos Fenólicos Totales

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales fue realizada por duplicado para cada lote, utilizando el método de Folin-Ciocalteu que midió la formación de complejos de color azul entre los compuestos fenólicos de la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu.³⁷

Previamente se preparó una curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones más la adición de la solución de Folin Ciocalteu al 10%, carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 7.5 % y Agua Ultrapura Tipo I.

Preparación de Soluciones:

- *Sol. Ácido gálico 0.3 mg/mL:* Se pesó 30 mg y se llevó a volumen con Agua Ultrapura Tipo I en una fiola de 10 mL. Se tomó 1 mL de la solución preparada y se llevó a volumen con Agua Ultrapura Tipo I en una fiola de 10 mL.
- *Sol. Folin Ciocalteu 10%:* se tomó 1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu y se llevó a volumen con Agua ultrapura Tipo I en una fiola de 10 mL.
- *Sol. Na₂CO₃ 7.5%:* Se pesó 3.75g de Na₂CO₃ y se llevó a volumen con Agua Ultrapura Tipo I en una fiola de 50mL.

Preparación de Curva de Calibración:

		Concentración (µg/mL)					
		0	1.99	3.97	5.96	7.95	9.93
Volumen (µL)	Nombre del Compuesto						
	Ácido gálico (0.3mg/mL)	0	20	40	60	80	100
	Folin Cioc. 10%	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Na ₂ CO ₃ 7.5%	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	Agua Ultrapura Tipo I	1020	1000	980	960	940	920
	Vol. Total	3020	3020	3020	3020	3020	3020

Se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Pasado el tiempo estimado se leyó la absorbancia a 750 nm.

Preparación de la muestra:

Se pesó 0.5 g de muestra desengrasada en tubo Falcon de 15 mL. Luego se agregó 5 mL de etanol (EtOH) al 80 %. Después se agitó por 5 minutos en un equipo de ultrasonido y centrifugó a 10 °C a 5000 rpm por 10 min. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante en una fiola de 25 mL (se repitió este procedimiento por tres veces) y se llevó a volumen con EtOH al 80% en la fiola de 25 mL. Luego se tomó 50 µL de solución preparada anteriormente, se añadió 1000 µL de Folin Ciocalteu 10%, en seguida, se agregó 1000 µL de Na₂CO₃ al 7.5 % y 970 µL de Agua Ultrapura Tipo I en un tubo de ensayo.

Finalmente, se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Pasado el tiempo estimado se leyó la absorbancia a 750 nm en el Espectrofotometro UV-VIS (Spectroquant® Pharo 300) y se determinó el contenido de fenoles totales en la muestra de chocolate cuyos resultados fueron expresados en miligramos de Equivalentes de Ac. Gálico (mg. EAG)/100 g muestra de chocolate.

Cálculos:

$$\text{Concentración } \mu\text{g/mL} = \frac{\text{Área de muestra } \pm b}{a}$$

Donde:

$$\text{Ecuación de la curva de calibración es: } y = ax \pm b$$

Los resultados fueron expresados en mg EAG/100 g de muestra chocolate.

mgEAG /100 g de muestra de chocolate

$$= \left(\frac{((\text{Concentración } \mu\text{g/mL}) \times 3020 \times 25) / (50 \times Pm)}{1000} \right) \times \% \text{ Desengrasado}$$

Donde:

$$\% \text{ Desengrasado} = 100 - \% \text{ grasa}$$

Pm: Peso muestra en gramos

4.6 Determinación de Catequina y Epicatequina

Preparación de la Curva de Calibración:

Para la determinación de Catequina y Epicatequina se preparó dos soluciones stock, cada una con concentración de 0.2 mg/mL. Utilizando ambas soluciones stock se hicieron 6 diluciones para la elaboración de la curva de calibración.

Dilución	Concentración Final (ppm)		Volumen (µL)		
	Catequina	Epicatequina	Catequina (0.2 mg/mL)	Epicatequina (0.2 mg/mL)	EtOH al 80%
1	10	20	90	180	1530
2	15	30	135	270	1395
3	20	40	180	360	1260
4	30	60	270	540	990
5	40	80	360	720	720
6	50	100	450	900	450

Preparación de la muestra:

Este análisis fue realizado por duplicado para cada lote. Se pesó aproximadamente 0.5 g de muestra desengrasada de chocolate en un tubo centrifuga.

Proceso de extracción: Se agregó 5 mL de EtOH al 80 % al tubo centrifuga y se llevó al equipo de ultrasonido por 15 min. Seguidamente, se agitó en el vortex por 1 min y se centrifugó por 10 min a 5000 rpm a 10 °C. Se transfirió el sobrenadante a una fiola de 10 ml. Se repitió el procedimiento anterior y se llevó a volumen con EtOH 80 % de la fiola de 10 mL. Se transfirió 1.8 mL de la solución a un vial a través de un filtro Phenomenex 0.45 µm con ayuda de una jeringa de tuberculina. Finalmente se llevó el vial para inyección en el Cromatógrafo Liquida de ultra alta eficacia (UHPLC Ultimate 3000).²⁶

• Condiciones cromatográficas:

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

Gradiente:

Tiempo (min)	ACN (µL)	Ac. 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

- Tiempo de análisis : 30 min

- Flujo : 1.5 mL/min
- Longitud de onda : 280 nm
- Temperatura: 35 °C
- Volumen de inyección de muestra: 10 uL

Se identificó los picos para Catequina y Epicatequina de la muestra problema y se anotó las áreas para los cálculos respectivos cuyos resultados fueron expresados en mg de catequina o epicatequina/100 g de muestra de chocolate.

Cálculos:

$$\text{Concentración } \mu\text{g/mL} = \frac{\text{Área de muestra } \pm b}{a}$$

Donde:

$$\text{Ecuación de la curva de calibración es: } y = a x \pm b$$

mg catequina o epicatequina /100 g de muestra de chocolate

$$= \left(\frac{((\mu\text{g de catequina o epicatequina /mL muestra desengrasada}) \times 10/Pm) \times \% \text{ Desengrasado}}{1000} \right)$$

Donde:

$$\% \text{ Desengrasado} = 100 - \% \text{ grasa}$$

Pm: Peso muestra en gramos

4.7 Actividad Antioxidante

4.7.1 Test de DPPH

Preparación de la curva de calibración

Se preparó una curva de calibración de Ácido Ascórbico de una concentración de 0.7 mg/mL (solución stock), a partir de esta solución se hicieron 6 diluciones como lo indica en la tabla y luego se mantuvieron en un lugar oscuro por 30 min.

		Concentración (mg/mL)					
		0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Volumen (µL)	Sol. Stock(Ac. Ascorbico 0.7 mg/mL)	0	10	20	30	40	50
	EtOH 80%	50	40	30	20	10	0
	DPPH	3950	3950	3950	3950	3950	3950

Solución de DPPH: Se pesó 1.97 mg de DPPH y se llevó a volumen con etanol al 80 % en una fiola de 50 mL.

Preparación de la muestra:

Este análisis se realizó por duplicado para cada lote. Se pesó 0.5 g de la muestra desengrasada, se llevó a 5 mL con EtOH al 80% en un tubo Falcon, se agitó en el equipo de ultrasonido por 5 min, se llevó al vortex por 1 min y se centrifugó por 10 min a 5000 rpm a 10 °C. El sobrenadante se trasvasó a una fiola de 25 mL (este procedimiento se realizó dos veces más). Finalmente se llevó a volumen con EtOH al 80% la fiola de 25 mL. A partir de este extracto se hicieron 6 diluciones por duplicado con los mismos volúmenes de la tabla anterior, sólo que en lugar de la solución stock fue el extracto. Luego se mantuvieron en un lugar oscuro por 30 min.

Se leyeron las absorbancias de las soluciones preparadas en un Espectrofotómetro UV-VIS (Spectroquant® Pharo 300) a una longitud de onda de 517 nm. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, cuyos valores sirven para calcular la IC₅₀ (Concentración inhibitoria media).⁴⁰

Cálculos:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Abs Tubo 1} - (\text{Abs Tubo \#})}{\text{Abs Tubo 1}} \right) \times 100$$

Donde:

- Abs Tubo 1: Absorbancia del Control de DPPH
- Abs Tubo #: tubo 2, 3, 4, 5 y 6

Cálculo de IC₅₀:

$$\% \text{ IC}_{50} = \left(\frac{50 \pm b}{a} \right)$$

Ecuación de la curva de calibración: $y = a x \pm b$

4.7.2 Test ORAC

Este análisis se realizó por duplicado para cada lote. Para la actividad antioxidante por test ORAC se prepararon los siguientes reactivos:

- *BUFFER FOSFATO 10 mM a pH 7.4:* Se pesó 0.53 g de KH_2PO_4 y 1.06 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en diferentes beakers y ambos se disolvieron con agua destilada. Ambas soluciones se trasvasaron y se llevó a volumen con agua destilada en un balón volumétrico de 1000 mL hasta obtener un pH de 7.4.
- *TROLOX 0.5 mg/mL:* Se pesó 5 mg de Trolox en una fiola de 10 mL y se enrasó a volumen con agua destilada.
- *FLUORESCEÍNA 1 μM :* Se pesó 3.32 mg de fluoresceína en una fiola de 10 mL y se enrasó a volumen con buffer 7.4. A partir de esta solución se tomó 10 μL se llevó a volumen con buffer 10 mM de pH 7.4 en una fiola de 10 mL.
- *APPH 250 mM:* Se pesó 678 mg de APPH y se llevó a volumen con buffer 10 mM de pH 7.4 en una fiola de 10 mL a 37 °C.

Preparación de la muestra:

Se pesó aproximadamente 250 mg de muestra desengrasada en tubos Falcon de 14 mL. Se realizó una extracción 2 veces con 5 mL (por cada extracción) del solvente Acetona: Agua Destilada: Ac. Acético. (La preparación de dicho solvente fue de 35 mL: 14.9 mL: 0.1 mL respectivamente, en un matraz de 50 mL). En cada extracción se llevó a un equipo de ultrasonido por 30 min y luego a la centrifuga a 3000 rpm a 4 °C por 10 min. A continuación, se colocó el sobrenadante en una fiola de 10 mL. Se hizo la dilución 1/625 (4992 μL de buffer 10 mM a pH 7.4 más 8 μL de muestra) y se homogenizó.

Preparación de la curva de calibración:

Se realizó las diluciones de acuerdo al siguiente el cuadro mostrado y se llevó a un volumen de 2 mL con Buffer 10 mM a pH 7.4 en tubos de ensayo.

Concentración final Trolox	μL de Trolox (0.5 mg/mL)
5 μM	5 μL
10 μM	10 μL
20 μM	20 μL
30 μM	30 μL
40 μM	40 μL

En la microplaca se colocó los reactivos y la muestra en el siguiente orden:

Reactivos	Blanco (uL)	Estándar (uL)	Muestra (uL)
Fluoresceína	150	150	150
Buffer fosfato	25		
Trolox		25	
Muestra			25
Se incubó la microplaca por 30 minutos a 37 °C			
APPH 37°C	25	25	25

Ubicación en la Microplaca:

	B	T2	T4	1A	2A	
	B	T2	T4	1A	2A	
	B	T2	T4	1A	2A	
	T1	T3	T5	1B	2B	
	T1	T3	T5	1B	2B	
	T1	T3	T5	1B	2B	

Donde:

- B: Blanco
- T1, T2, T3, T4, T5: Trolox a concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 40 µM; respectivamente.
- 1 A, 1 B: lote 1 analizado por duplicado
- 2 A, 2 B: lote 2 analizado por duplicado

La intensidad de la fluorescencia fue determinada cada 2 minutos mediante un detector de microplacas (Hidex Chameleon) con una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente. La medición se detuvo cuando el valor final de la concentración mayor de trolox (T5) fue 10 veces menor que su valor inicial. Los resultados fueron expresados en µmol Trolox Equivalente (TE) en 1 g/L de muestra chocolate.⁴¹⁻⁴³

Cálculos:

$$AUC = 1 + \sum_{i=2}^{i=n} f_1/f_0$$

Cálculo del área bajo la curva (AUC) y NetAUC por muestra y estándar.

* Dado que se hicieron 3 lecturas de fluorescencia (estándar y muestra), se hizo promedio de estas lecturas.

* La Fluorescencia relativa calculada por f_1/f_0 (f_1 : fluorescencia medida cada tiempo, f_0 . Fluorescencia en el $t=0$)

$NetAUC = AUC \text{ muestra} - AUC \text{ blanco}$

*Se graficó las concentraciones de Trolox vs.NetAUC

*Ecuación de la recta:

$$\text{Concentración } \mu M TE = \frac{\text{Área de muestra} \pm b}{a}$$

Donde:

Ecuación de la curva de calibración es: $y = ax \pm b$; y el $R^2 \geq 0.95$

Concentración $\mu mol TE$ en 1g de muestra chocolate

$$= \left(\frac{\text{Concentración } \mu M TE \times 625 \times 8}{1000} \right) \left(\frac{\text{Peso muestra en gramos}}{10} \right) \\ /g \text{ de chocolate por } g \text{ de muestra desengrasada}$$

g de chocolate por g de muestra desengrasada

$$= 1 / (\text{muestra desengrasada que hay en 1 g de chocolate})$$

muestra desengrasada que hay en 1 g de chocolate = (100 - % desengrasado) / 100

$$\% \text{ desengrasado} = 100 - \% \text{ grasa}$$

4.8 Determinación de compuestos volátiles

Este análisis fue realizado por duplicado para cada lote. A un vial Head Space de 25 mL se agregó aproximadamente 2 g de muestra de cobertura de chocolate, luego se cerró herméticamente y se llevó al equipo de ultrasonido por 5 min. Posteriormente se colocó la fibra 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. Se utilizó un GC-MS (Agilent Technologies 7890A – 5975C) con helio como gas portador (Flujo: 1 mL/min) y una columna Agilent 128-7052DB-WAX (50 m x 200 μm x 0.2 μm), temperatura de inyección 250 °C, temperatura del detector MS 230 °C, ratio 200:1 y un tiempo de corrida total de 58 minutos. La columna se mantuvo a 40 °C durante 10 min, luego la temperatura aumentó 5 °C/min hasta 120 °C donde se mantuvo por 5 min, a continuación se

incrementó a 10 °C/min hasta 240 °C por 15 min y post-run de 2 min a 240 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 µL.⁴⁴ Terminado el tiempo de análisis de cada muestra se procedió a determinar la composición química de los compuestos volátiles mediante la comparación de sus espectros de masas con los espectros de masas de las librerías NIST 08 y FLAVOR 02.

4.9. Análisis Estadístico

Todos los análisis fueron realizados por triplicado y para cada variable se reportan los promedios con sus respectivas desviaciones estándar. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS versión 19 con la prueba T-Student y asumiendo varianzas iguales. La diferencia entre las medias fue considerada estadísticamente significativa si $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

5.1 Análisis Proximal de la muestra

En la tabla 1, se muestran los resultados del análisis proximal de ambos lotes (Lote 58 y Lote 59) de muestras de chocolate La Ibérica. Cada resultado se expresa como porcentaje \pm la desviación estándar, obtenidos del promedio de los resultados de cada análisis por triplicado.

La cobertura de chocolate se caracteriza por su alto contenido de carbohidratos (>50%) y grasa (>30%).

Tabla 1. Análisis proximal de cobertura de chocolate

Componentes	Contenido (%)	
	Lote 58	Lote 59
Humedad	1.82 \pm 0.03	1.58 \pm 0.06
Ceniza	1.81 \pm 0.03	1.78 \pm 0.00
Proteína	6.47 \pm 0.04	6.56 \pm 0.03
Grasa	32.72 \pm 0.21	31.61 \pm 0.07
Fibra	3.24 \pm 0.09	0.69 \pm 0.01
Carbohidratos	53.95 \pm 0.07	57.78 \pm 0.11

Hubieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los lotes para los promedios de grasas, humedad, fibra y carbohidratos.

5.2 Determinación del Perfil de Ácidos Grasos

El perfil de ácidos grasos en ambos lotes de cobertura de chocolate fue determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En la tabla 2 se muestran los tiempos de retención (t_R) y concentración relativa (porcentaje de área relativa) de cada uno de los ácidos grasos.

Los principales ácidos grasos fueron los saturados palmítico (26%) y esteárico (32%) y los insaturados oleico (38%) y linoleico (2%). No hubo diferencias en los perfiles de ácidos grasos de ambos lotes.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de cobertura de chocolate

Ácido Graso	Muestra	Tiempo de Retención (min)	Área Relativa (%)
Mirístico (14:0)	Lote 58	15.95	0.05
	Lote 59	15.95	0.05
Palmitoleico (16:1)	Lote 58	20.97	0.21
	Lote 59	20.97	0.20
Palmítico (16:0)	Lote 58	21.84	26.55
	Lote 59	21.83	26.75
Margárico (17:2)	Lote 58	25.38	0.18
	Lote 59	25.38	0.18
Linoleico (18:2)	Lote 58	28.45	2.42
	Lote 59	28.45	2.39
Oleico (18:1)	Lote 58	29.08	38.35
	Lote 59	29.06	37.64
Esteárico (18:0)	Lote 58	30.25	31.99
	Lote 59	30.23	32.45

No hubieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los lotes para los promedios de los ácidos grasos.

5.3 Determinación de Teobromina y Cafeína

Para la determinación del contenido de metilxantinas de ambos lotes se utilizó una curva de calibración de Teobromina (Figura 1) y Cafeína (Figura 2).

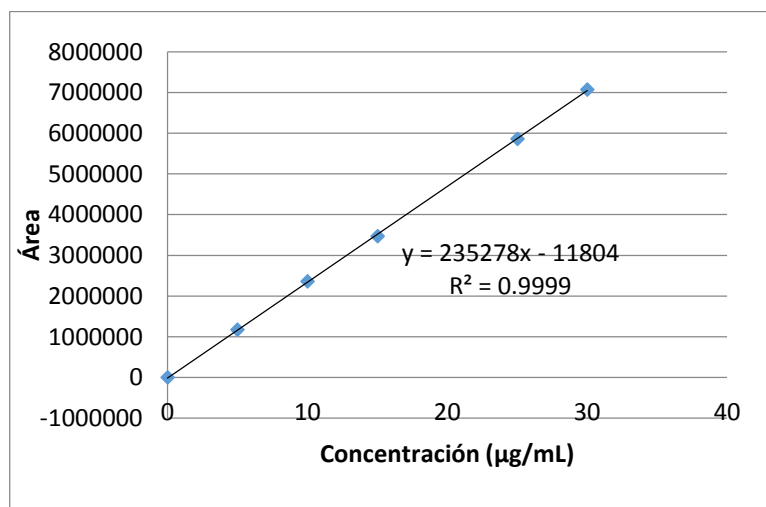


Figura 1. Curva de calibración de Teobromina

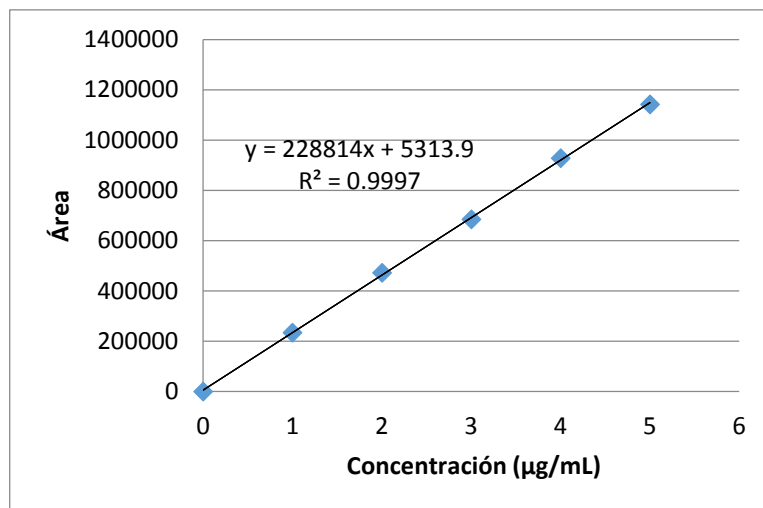


Figura 2. Curva de calibración de Cafeína

La tabla 3 muestra el contenido de metilxantinas de ambos lotes expresados como miligramos de teobromina o cafeína por 100 gramos de muestra de chocolate. Se puede observar que para ambos lotes, el contenido de teobromina es hasta 2.4 veces mayor que el de cafeína.

Tabla 3. Contenido de metilxantinas en cobertura de chocolate

	Contenido de Teobromina (mg/100 g chocolate)	Contenido de Cafeína (mg/100 g chocolate)
Lote 58	394.94 ± 6.40	174.54 ± 3.49
Lote 59	408.96 ± 2.65	172.85 ± 1.04

No hubieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los lotes para los promedios de teobromina y cafeína.

5.4 Determinación de concentración de Compuestos Fenólicos

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos en la muestra de chocolate se utilizó una curva de calibración de ácido gálico mostrada en la figura 3.

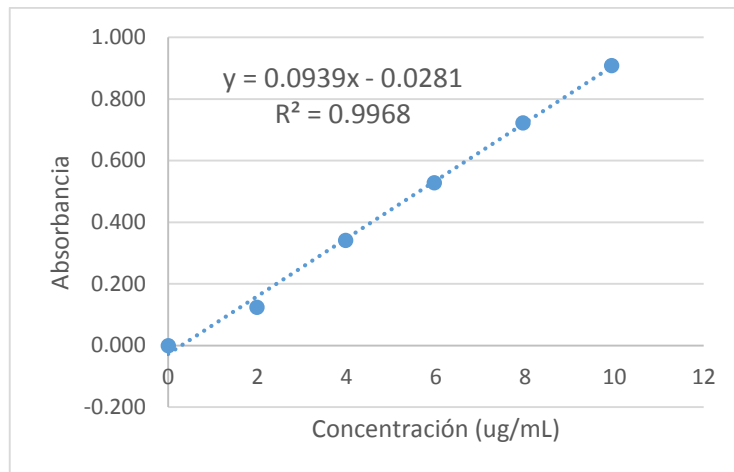


Figura 3. Curva de calibración de Ácido Gálico

En la siguiente tabla se muestran los contenidos de compuestos fenólicos totales de ambos lotes expresados como miligramos (mg-equivalente) de ácido gálico (EAG) por 100 gramos de chocolate. Hubieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido de compuestos fenólicos de ambos lotes, la concentración en porcentaje estuvo alrededor del 1.5%.

Tabla 4. Contenido de compuestos fenólicos totales en cobertura de chocolate

	Contenido de Compuestos Fenólicos (mg AG/100 g chocolate)
Lote 58	1491.97 ± 0.9
Lote 59	1515.35 ± 2.3

5.5 Determinación de Catequina y Epicatequina

El contenido de catequina y epicatequina en ambos lotes fue calculado en base a curvas de calibración con estándar externo (Figuras 4 y 5).

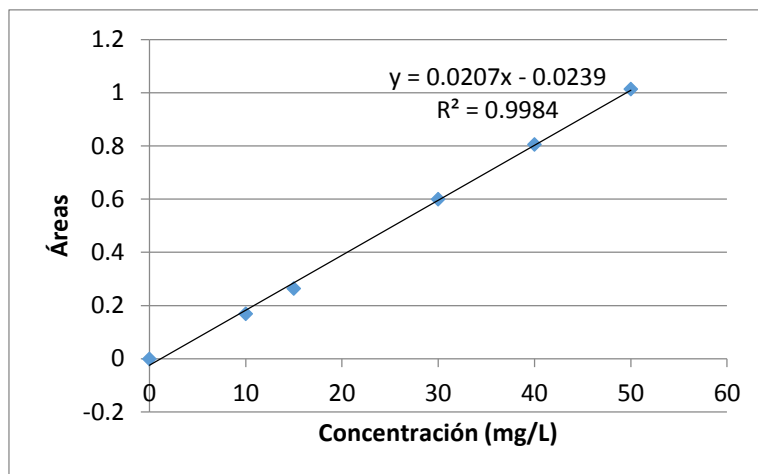


Figura 4. Curva de calibración de catequina

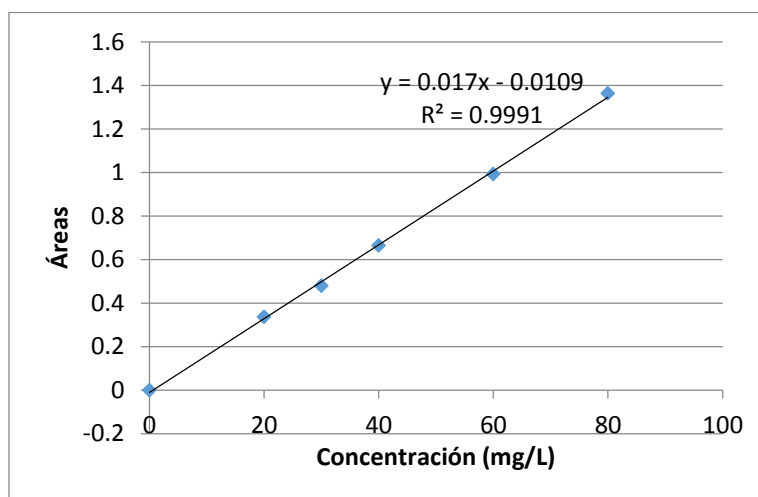


Figura 5. Curva de calibración de epicatequina

En la tabla 5 se muestran los contenidos de catequina y epicatequina de ambos lotes expresados como miligramos por 100 gramos de chocolate. Hubieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el contenido de estos compuestos entre ambos lotes. El contenido de epicatequina fue 1.9 veces mayor que el de catequina.

Tabla 5. Contenido de catequina y epicatequina en cobertura de chocolate

	Contenido de Catequina (mg/100 g chocolate)	Contenido de Epicatequina (mg/100 g chocolate)
Lote 58	34.24 ± 0.03	63.68 ± 0.06
Lote 59	34.83 ± 0.12	64.74 ± 0.05

5.6 Actividad Antioxidante

5.6.1 Test de DPPH

En la figura 6 se muestra la curva de concentración versus porcentaje de inhibición de radicales DPPH para el ácido ascórbico, el cual fue usado como control positivo. La concentración efectiva media (EC_{50}) del ácido ascórbico fue calculada a partir de esta curva. De manera similar se procedió para las muestras de chocolate.

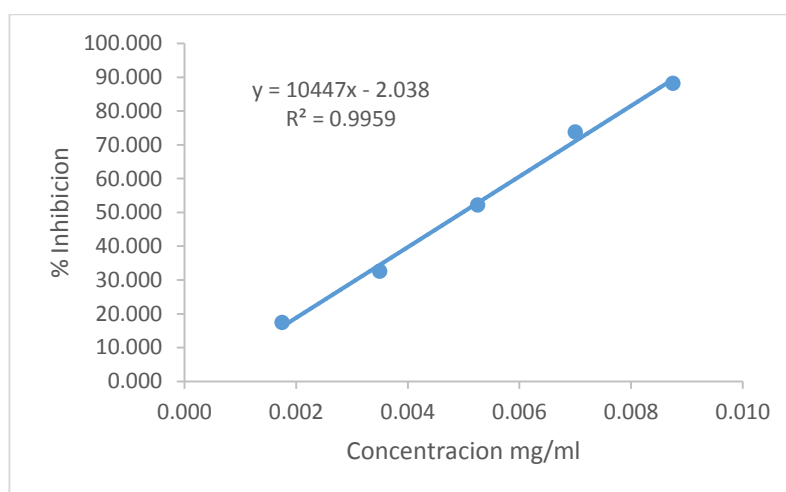


Figura 6. Concentración versus porcentaje inhibición de radicales DPPH para el Ácido Ascórbico

La tabla 6 muestra las EC_{50} calculadas para ambos lotes de chocolate y para el ácido ascórbico. Se puede observar que la EC_{50} del ácido ascórbico es hasta 20 veces menor que las de las muestras de chocolate.

Tabla 6. Concentraciones efectivas medias en el test de DPPH

	EC_{50} (mg/mL)
Lote 58	0.146 ± 0.00
Lote 59	0.142 ± 0.00
Ácido ascórbico	0.00498 ± 0.00

No hubieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la actividad antioxidante de ambos lotes de chocolate.

5.6.2 Test ORAC

Para la determinación de actividad antioxidante por el test de ORAC se hizo una curva de calibración de Trolox (Figura 7).

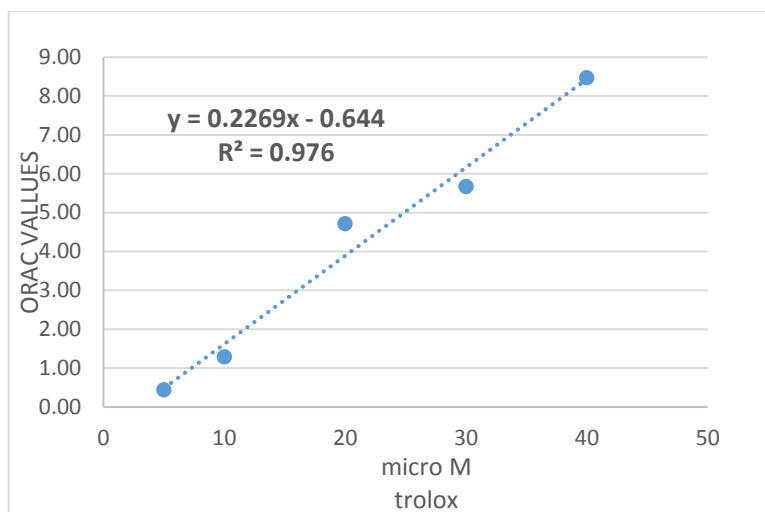


Figura 7. Curva de Calibración de Trolox

En la tabla 7 se muestra las actividades antioxidantes de las muestras de chocolate en el test de ORAC, expresadas como μmol Trolox Equivalente/g chocolate.

Tabla 7. Actividad antioxidante de muestras chocolate en el test de ORAC

	μmol Trolox Equivalente/g chocolate
Lote 58	489.07 ± 8.84
Lote 59	477.21 ± 10.50

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los resultados del test de ORAC de ambos lotes.

5.7 Determinación de compuestos volátiles

Con la finalidad de conocer de forma preliminar las estructuras químicas de los compuestos volátiles en la cobertura de chocolate, se analizó el lote 58 mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

A partir de los espectros de masas de cada uno de los picos principales obtenidos y utilizando las bases de datos NIST 08 y FLAVOR 02, se logró detectar 33 compuestos,

los cuales se muestran en la Tabla 8. Para cada uno de los compuestos volátiles se detalla porcentaje de área relativa (concentración relativa), tiempo de retención (t_R) y probabilidad de identificación de la estructura química. Los compuestos mayoritarios fueron el ácido acético (57.23%), acetato de etilo (11.67%) y estireno (4.26%).

Tabla 8. Compuestos volátiles de la cobertura de chocolate (Lote 58)

N°	Nombre de compuesto	t_R (min)	Área relativa (%)	Probabilidad
1	Compuesto desconocido	3.69	0.73	-
2	Alcohol Etilico	4.11	0.41	72
3	Compuesto desconocido	4.30	2.20	4
4	Cloruro de metileno	4.65	1.28	94
5	Acetato de etilo	5.71	11.67	91
6	Ácido acético	6.84	57.23	91
7	1-metoxi, 2-propanol	7.47	0.28	86
8	Compuesto desconocido	12.98	0.23	4
9	2,3-Butanediol	14.08	1.79	90
10	Compuesto desconocido	14.70	0.39	-
11	Etilbenceno	17.13	1.18	90
12	1,3-dimetil-benceno	17.59	0.07	91
13	Estireno	18.67	4.26	97
14	Butirolactona	19.74	0.99	90
15	Compuesto desconocido	19.82	0.24	38
16	2-metil-5-(1-metiletil)-Biciclo[3.1.0]hex-2-eno	20.23	0.35	87
17	Compuesto desconocido	20.43	0.31	10
18	α -Pino	20.56	0.59	96
19	Compuesto desconocido	20.73	0.29	4
20	Benzaldehido	21.94	0.34	95
21	β -Felandreno	22.25	0.36	91
22	6,6-dimetil-2-metilen-Biciclo[3.1.1]heptano	22.46	0.57	97
23	β -Mirceno	22.87	0.23	91
24	1,2,3-trimetil-Benceno	23.12	0.24	83
25	Pyrazine, trimethyl-	23.48	0.78	90
26	3-Careno	23.67	1.20	97
27	1-metil-4-(1-metiletil)-7-Oxabiciclo [2.2.1] heptano	23.93	0.12	95
28	1-metil-2-(1-metiletil)-Benceno	24.30	1.72	97
29	D-Limonene	24.46	3.35	94
30	Compuesto desconocido	24.54	3.32	76
31	Compuesto desconocido	25.01	0.21	64
32	Compuesto desconocido	25.16	0.24	64
33	Dodecano	25.26	2.80	90

VI. DISCUSIÓN

El análisis del contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del cacao y sus productos derivados como el chocolate es de importancia para controlar la calidad de la materia prima y del proceso de producción de chocolate; asimismo, es importante para conocer el potencial nutricional-energético y de beneficio para la salud de dichos productos.

Los ingredientes principales para la elaboración de un chocolate son los sólidos de cacao (pasta de cacao), manteca de cacao, azúcar y lecitina como emulsificador. Las principales categorías comerciales de los chocolates son el chocolate oscuro, el blanco y el chocolate de leche; estos se diferencian entre sí por los contenidos en pasta de cacao, grasa de leche y manteca de cacao.⁴⁵

Dada esta composición del chocolate, es lógico que los principales componentes nutricionales sean los carbohidratos, la grasa y las proteínas. Por ejemplo, Salinas & Bolívar investigaron diversos tipos de chocolates Venezolanos, encontrando en ellos un porcentaje de carbohidratos en un rango de 48-52%, grasa 30-37% y proteínas 5-13%.³⁴ Torres-Moreno et al. investigaron chocolates procedentes de Ghana y Ecuador encontrando que a pesar de tratarse de diferentes localidades, los porcentajes de carbohidratos, grasa y proteína fueron muy similares (60.0, 30.5 y 6.4%, respectivamente).⁴⁶

El chocolate de La Ibérica se caracterizó por una composición nutricional similar a la de los chocolates de Ghana y Ecuador, con un contenido de carbohidratos, grasas y proteínas de 55.9, 32.2 y 6.5%, respectivamente. El valor energético calculado para 100 g de chocolate La Ibérica es de 539.4 Kcal; este valor debe ser tomado en cuenta a la hora de calcular las dietas de los consumidores.

La grasa del cacao contiene principalmente triglicéridos de los ácidos grasos oleico, esteárico y palmítico. Estos ácidos grasos también son los principales en los productos derivados como el chocolate: Por ejemplo, los chocolates de Ghana y Ecuador mostraron concentraciones de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico igual a 28.0, 35.2, 32.8 y 2.2%.⁴⁶

El chocolate La Ibérica contenía porcentajes similares de dichos ácidos grasos (26.6, 32.2, 38.0 y 2.4%, respectivamente). El mayor porcentaje estaba conformado por los

ácidos grasos saturados (58.8%), seguidos de los mono y poli-insaturados (38.0 y 2.4%). Si bien el contenido de ácido esteárico en los chocolates es alto, se trata de un ácido graso saturado peculiar por considerarse no aterógeno, ya que el exceso de este ácido en el organismo es convertido a ácido oleico en el hígado por medio de una enzima desaturasa.³⁴

Un estudio clínico doble ciego contra placebo utilizando 50 g de chocolate oscuro encontró que los sujetos que recibían el producto se sentían más energía, más motivados y más alertas en el trabajo.⁴⁷ Se sabe que el cacao y el chocolate contienen diversos compuestos bioactivos, de los cuales, principalmente la teobromina se encuentra en mayor cantidad y la cafeína en menor cantidad; además ambos presentan actividad sico-farmacológica.

Según Todorovic et al.,³ 50 g de chocolate oscuro o 30 g de polvo de cacao tienen suficiente cantidad de teobromina como para producir un efecto neurofisiológico. Si bien la cafeína tiene una capacidad 5 veces mayor que la teobromina para estimular el sistema nervioso central, la última tiene una mayor duración de vida y se encuentra en mayor cantidad en el chocolate.^{29,48}

Por ejemplo, Todorovic et al.³ estudiaron diversos tipos de chocolate elaborados en Serbia y encontraron que el contenido de teobromina variaba de 0.5 a 2.2 g/100 g, mientras que el de cafeína era mucho menor (0.03 -0.10 g/100 g). Comparando estos resultados con los de la cobertura de chocolate La Ibérica, encontramos que este presenta valores ligeramente menores de teobromina (0.4 g/100 g), pero algo mayores de cafeína (0.17 g/100 g). Se podría esperar entonces que el efecto estimulante sobre el sistema nervioso central sea similar para las muestras de ambos países. Por otro lado, el efecto esperado sobre el SNC para el chocolate La Ibérica es mucho mayor que por ejemplo el del chocolate de leche Milka (teobromina: 0.1 g/100 g; cafeína: 0.01 g/100 g).⁴⁹

Numerosos estudios mencionan los efectos beneficiosos de los polifenoles del cacao sobre la salud cardiovascular. Por ejemplo. En un ensayo clínico randomizado y controlado realizado por Pereira et al. en 60 voluntarios sanos jóvenes, se pudo establecer que el consumo diario por un mes de 10 g de chocolate al 70% induce varios efectos beneficiosos sobre la presión arterial, la función vascular y mejora de la interacción vascular-ventricular; resultando todo ello en que el chocolate con alto

contenido de compuestos fenólicos puede ser un alimento funcional promisorio para prevención primaria de enfermedades cardiovasculares.⁵⁰

Este efecto protector del sistema cardiovascular fue reportado previamente para otros alimentos o bebidas como el vino. Pimentel et al. lograron demostrar que 49 g de un chocolate oscuro tiene la misma cantidad de fenólicos (flavonoides) que 196 ml del vino Tannat, que es la cantidad diaria recomendada para producir efectos beneficiosos para la salud en un adulto de 70 Kg de peso.⁵¹

La cobertura de chocolate La Ibérica mostró un alto contenido de compuestos fenólicos (1.5 g/100 g), mayor a lo reportado para diversos chocolates elaborados en Serbia (0.7 – 1.3 g/100 g).³ La diferencia se debe principalmente a la materia prima y al proceso de elaboración del chocolate.

En cuanto a la materia prima, se sabe que la cantidad de polifenoles depende de la variedad de cacao y el tiempo de fermentación escogido para el proceso poscosecha. La concentración de polifenoles en el cacao disminuye a medida que aumenta el tiempo de fermentación.⁵²

En cuanto a la concentración de polifenoles en el chocolate, esta se ve principalmente afectada por el porcentaje de sólidos de cacao utilizados.⁵³

Existen estudios que sugieren que el cacao y chocolate con alto contenido de flavonoides pueden tener efecto cardioprotectivo debido a la interferencia de estos compuestos con varios de los mecanismos asociados a la aterosclerosis. Los efectos beneficiosos de estos flavonoides incluyen: actividad antioxidante, mejora de la función endotelial, disminución de la presión arterial, disminución de la activación plaquetaria y modulación del sistema inmune y del proceso inflamatorio.⁵⁴

Un subgrupo de la familia de los flavonoides son los flavanoles (flavan-3-oles), cuyos principales representantes son la catequina y la epicatequina. Algunos estudios reportan que la epicatequina como el compuesto más activo, responsable de los efectos sobre la salud cardiovascular asociados al cacao y al chocolate.⁵⁵

Alañón et al. evaluaron 41 muestras de diversos tipos chocolate obtenidos en los mercados de Reading, UK. El contenido de epicatequina y catequina en estos chocolates fue 8.1-89.5 y 1.8-40.8 mg/100 g, respectivamente. El contenido de estos flavanoles fue siempre mayor en los chocolates oscuros que en los de leche.² Un estudio

sobre chocolates oscuros de Nestlé-Turquía, mostró valores menores de epicatequina y catequina (4.7-7.9 y 2.4-6.9 mg/100 g, respectivamente).⁵⁵

Los contenidos de catequina y epicatequina en el chocolate La Ibérica (34.5 y 64.2 mg/100 g, respectivamente) fueron similar al de los chocolates de Reading.

La actividad antioxidante de la cobertura de chocolate La Ibérica fue medida por el test de DPPH y ORAC. Ambos métodos son utilizados con frecuencia para medir la capacidad de neutralizar radicales en un sistema *in vitro* y dan una idea preliminar de lo que podría ocurrir en un sistema *in vivo*.

En el caso del test de DPPH, la actividad se expresa como concentración efectiva media (EC_{50}), significando esto que a menor EC_{50} , mejor actividad antioxidante.

Vertuani et al. evaluaron la actividad antioxidante en el test de DPPH de diversos chocolates de leche y oscuros. La actividad antioxidante de los chocolates oscuros (EC_{50} = 0.28-0.81 mg/mL) fue mejor que las de los chocolates de leche (EC_{50} = 3.82-7.72 mg/mL).⁵⁶

El chocolate La Ibérica (EC_{50} = 0.14 mg/mL) mostró mejor actividad antioxidante que los chocolates evaluados por Vertuani et al.; sin embargo su potencia es mucho menor que la del control positivo (ácido ascórbico, EC_{50} = 0.005 mg/mL).

Actualmente, uno de los ensayos más utilizados para medir la actividad antioxidante es el test de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), donde la actividad se reporta a través de la comparación con el antioxidante Trolox, el cual es un análogo de la vitamina E. El test de ORAC se utiliza para diversas muestras (alimentos, bebidas, plasma, etc.) y últimamente se viene aplicando también al área de los cosméticos y nutracéuticos.⁵⁷

Para el test de ORAC, la actividad se expresa como micromoles de trolox equivalente por gramo de chocolate ($\mu\text{mol TE/g}$ chocolate). El valor obtenido para la cobertura de chocolate La Ibérica (483.1 $\mu\text{mol TE/g}$) fue mayor con respecto a los chocolates de leche (71.3 $\mu\text{mol TE/g}$) pero menor para los chocolates oscuros (1031.9 $\mu\text{mol TE/g}$) que evaluaron Wu et al.⁴¹

El perfil de compuestos volátiles del chocolate depende del genotipo del cacao, su origen, condiciones agroclimáticas del cultivo, proceso poscosecha, secado y

almacenamiento. Cada variedad de cacao puede resultar en aromas y sabores característicos, que pueden cambiar o ser influenciados durante la elaboración del chocolate.⁵⁸

Algunos estudios sugieren que los compuestos claves del aroma del cacao son por ejemplo: aldehídos (2-metil-propanal, metilbutanal, fenilacetaldehído), pirazinas (2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina, tetrametilpirazina), ácidos (ácido 3-metilbutanoico) y el furaneol.³² Liu et al. estudiaron los compuestos volátiles de chocolate oscuro provenientes de China y encontraron que los principales compuestos volátiles fueron ácido 3-metilbutanoico, ácido acético y 3-metilbutanal.³²

Para el chocolate La Ibérica al 52% también se encontró una gran concentración relativa de ácido acético, lo cual se puede deber a que el tiempo del proceso de conchado no fue suficiente para retirar este compuesto. Las concentraciones de otros compuestos volátiles relacionados al aroma típico del chocolate se vieron opacadas por la alta concentración del ácido acético.

El análisis estadístico realizado en los promedios de las variables analizadas en ambos lotes arrojó algunas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para algunos análisis químicos; sin embargo, estas diferencias son relativamente mínimas y de poca importancia en términos prácticos para la empresa.

Luego de una búsqueda exhaustiva de la literatura científica, se puede aseverar que este es el primer estudio que se realiza en un chocolate peruano. Los resultados obtenidos indican que la cobertura de chocolate al 52% de La Ibérica contiene buena cantidad de metilxantinas (teobromina y cafeína) y compuestos fenólicos antioxidantes que pueden ser beneficiosos para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, se recomienda el consumo moderado de este producto, debido a su alto valor energético y contenido de grasa.

VII. CONCLUSIONES

- El análisis proximal de la cobertura de chocolate La Ibérica al 52% dio como resultado un alto contenido de Carbohidratos (53.9-57.8%), Grasa (31.6-32.7%) y proteínas (6.5-6.6%).
- El perfil de ácidos grasos se caracteriza por la presencia mayoritaria de los saturados palmítico (26.5-26.8%) y esteárico (32.0-32.4%), así como del ácido graso insaturado oleico (37.6-38.3%).
- La concentración de teobromina (394.9-408.9 mg/100 g chocolate) fue 2.4 veces mayor que la de cafeína (174.5-172.9 mg/100 g chocolate).
- El contenido de compuestos fenólicos totales, expresados como mg de ácido gálico, fue de 1492.0-1515.3 mg/100 g chocolate (1.5%).
- La concentración de epicatequina (63.7-64.7 mg/100 g chocolate) fue 1.9 veces mayor que la de catequina (34.2-34.8 mg/100 g chocolate).
- La actividad antioxidante en el test de DPPH, expresada como EC_{50} (concentración efectiva media), fue de 0.146-0.142 mg/ml. Mientras que la actividad en el test de ORAC fue de 477.21-489.07 μ mol equivalentes de Trolox/g chocolate.
- Por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se lograron detectar 33 compuestos volátiles. Los compuestos mayoritarios fueron el ácido acético (57.23%), acetato de etilo (11.67%) y estireno (4.26%).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDÚJAR, I.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RÍOS J. L. 2012. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Journal of Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012, 1-23.
2. ALAÑÓN, M.E.; CASTLE S.M.; SISWANTO P.J.; CIFUENTES-GÓMEZ T.; SPENCER J.P.E. 2016. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. *Food Chemistry* 208 (1), 177–184.
3. TODOROVIC, V.; RADOJCIC, I.; TODOROVIC, Z.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M; SOBAJIC, S. 2015. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolate produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis* 41, 137-143.
4. FIELD, D.; WILLIAMS, C.; BUTLER, L. 2011. Consumption of cocoa flavanols results in an acute improvement in visual and cognitive functions. *Physiology & Behavior* 103, 255-260
5. PÉREZ, H. 2006. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar XL (3), 20-28. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120665003>
6. HOPPER, L.; KAY, C.; ABDELHAMID, A.; KROON, P; COHN, J.; RIMM, E.; CASSIDY, A. 2012. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 95, 740-751.
7. OSTERTAG, L.; KROON, P.; WOOD S.; HORGAN, G.; CIENFUEGOS-JOVELLANOS, E.; SAHA, SH.; DUTHIE, G.; DE ROOS, B. 2013. Flavan-3-ol-enriched dark chocolate and white chocolate improve acute measures of platelet function in a gender-specific way - a randomized - controlled human intervention trial. *Molecular Nutrition and Food Research* 57, 191-202.
8. FRANCO, R.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. 2013. Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Journal of Nutrients* 5, 4159-4173. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/10/4159>
9. GIL, A.; ROJAS, L.; ATEHORTUA, L.; LONDOÑO, J. 2011. Effect of Fermentation and Sun Drying on Phytochemical Composition of Native Colombian Cocoa. Proceedings of the 6th CIGR Section VI International Symposium "Towards a Sustainable Food Chain". *Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management*, 1-6.

10. Salón del Cacao y Chocolate Edición 2011. Disponible en: <http://www.salondelcacaoychocolate.pe/salon2.html>
11. La Ibérica. Disponible en: <http://www.laiberica.com.pe>
12. Innovación Tecnología en confitería y Chocolatería. Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social (FUSADES). Disponible en: <http://fusades.org/sites/default/files/investigaciones/sistematizacionchocolate2-140807121529-phpapp02.pdf>
13. MOSCOL, M.; ESPINOZA, E.; MENDOZA, L.; ROJAS, J. 2012. Manual de manejo del cultivo de cacao blanco de Piura. Ministerio de Agricultura del Perú. 1ra Edición, 64-69. Disponible en: http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/cacao/manual_cacao_blanco_piura.pdf
14. ARGÜELLO, A.; MANTILLA, J.; VARGAS, J. 2003. Guía Técnica para el Productor de Cacao. Una experiencia participativa y práctica. Federación Nacional de cacaoteros, 24-30.
15. MCSHEA, A.; RAMIRO-PUIG, E.; MUNRO, S.; CASADESUS, G.; CASTELL, M.; SMITH M. 2008. Clinical benefit and preservation of flavonols in dark chocolate manufacturing. *Nutrition Reviews* 66, 630-641.
16. FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS (FEDECACAO). 2004. El beneficio y características físico químicas del cacao (*Theobroma cacao* L.). Fondo Nacional del Cacao, Bogotá (Colombia). Editorial Produmedios, 1-26.
17. EDOH ADABE, K.; LIONELLE NGO-SAMNICK, E. 2014 Cocoa Production and Processing. The Pro-Agro Collection, 31-39. Disponible en: - http://publications.cta.int/media/publications/downloads/1800_PDF.pdf
18. BRANDT, R.; MARTIN, K. 2001. The Food Processing Residual Management Manual. First Edition 1994, Pub. No. 254-5400-100. Chapter 16 Bean and Grain Case Study, 166-167.
19. International Cocoa Organization (ICCO). 2013. Processing Cocoa. Disponible en: <http://www.icco.org/about-cocoa/processing-cocoa.html>
20. FINS, L.; SOMARRIBA, E.; QUESADA, F. 2013. La historia del cacao y del chocolate. Centro Agronómico tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Colección Escuelas de Campo N° 7, 26-29.
21. CODEX STAN 87-1981, Rev.1-2003. NORMA PARA EL CHOCOLATE Y LOS PRODUCTOS DEL CHOCOLATE.
22. BIRUETE, A.; JUAREZ, E.; SIEIRO, E.; ROMERO, R.; SILENCIO, JL. . 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría* 76 (3), 136-145.

23. QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Editorial Nutrición Hospitalaria* 27, 76-89.
24. GÜLÇİN, I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* 86, 345–391.
25. FOTI, M.; DAQUINO, C.; GERACI, C. 2004. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions. 2004. *Journal of Organic Chemistry* 69, 2309–2314.
26. NATSUME, M.; OSAKABE, N.; YAMAGISHI, M.; NAKAMURA, T.; MIYATE, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. 2000. Analysis of Polyphenols in Cacao Liquor, Cocoa and Chocolate by Normal-Phase and Reversed-Phase HPLC. *Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, 2581-2587.
27. DA SILVA MEDEIROS, N.; KOSLOWSKY, R.; FARIAS, M.; FUNCHAL, C.; DANI, C. 2015. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Types of Chocolate, Milk, Semisweet, Dark, and Soy, in Cerebral Cortex, Hippocampus, and Cerebellum of Wistar Rats. *Biochemistry Research International* 2015, 1-9.
28. BRILLO, E.; DI RENZO G.C. 2015. Chocolate and other cocoa products: effects on human reproduction and pregnancy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1-22
29. MITCHELL, E.S.; SLETTENAAR, M.; VD MEER, N.; TRANSLER, C.; JANS, L.; QUADT, F.; BERRY, M. 2011. Differential contributions of theobromine and caffeine on mood, psychomotor performance and blood pressure. *Journal of Physiology & Behavior* 104, 816–822.
30. PURA, J. 2001. Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3579-3583.
31. MISNAWI and ARIZA, B.T.S. 2011. Use of gas chromatography–olfactometry in combination with solid phase micro extraction for cocoa liquor aroma analysis. *International Food Research Journal* 18, 829-835.
32. LIU, J.; LIU, M.; HE, C.; SONG, H.; GUO, J.; WANG, Y.; YANG, Y.; YANG, H. SU X. 2015. A comparative study of aroma-active compounds between dark and milk chocolate: relationship to sensory perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 1362-1371.
33. ALBAK, F.; TEKIN, A. 2015. Variation of total aroma and polyphenol content of dark chocolate during three phase of conching. *Journal of Food Science and Technology*, 1-8.

34. SALINAS, N.; BOLIVAR W. 2012. Ácidos grasos en chocolates venezolanos y sus análogos. *Anales Venezolanos de Nutrición* 25, 34 - 41.
35. GRIGUOL, V.; LEON-CAMACHO, M.; VICARIO, I.M. 2007. Revisión de los niveles de ácidos grasos trans encontrados en distintos tipos de alimentos. *International Journal of Fats and Oils. Revista Grasas y Aceites. Editorial CSIC* 58, 87-98.
36. FRANK, D.; PAT, S.; ALLEN, V. 2005. Agilent Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. Agilent Technologies.
37. KERN & SOHN GMBH. 2012. Application notes Moisture analyzer Version 1.0., 1-42
38. A.O.A.C. INTERNATIONAL. 2010. Official method of analysis of A.O.A.C International. 18th Edition. Current through revision 3. Chapter 31 Cacao Bean and Its Products, 1-17.
39. RAND, W.; PENNINGTON, J.; MURPHY, S.; KLENSIN, J. 1991. Compiling Data for Food Composition Data Bases. United Nations University Press, Tokyo, 21-22.
40. OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; ABDUL, N.; ADENAN, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* 100, 1523–1530.
41. WU, X.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; GEBHARDT, S.; PRIOR, R. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4026-4037.
42. OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4619-4626.
43. DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; SUBERVIOLA, J.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. 12003. ORAC- Fluorescein as a Model for Evaluating Antioxidant Activity of Wines. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 12/53, 133-136.
44. RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.; OROZCO-AVILA, I.; LUGO-CERVANTES, E.; JARAMILLO-FLORES, M.E. 2011. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International* 44, 250-258.
45. ANÁLISIS COMPARATIVO CHOCOLATE CON LECHE. *Revista Consumer* Febrero 2004, páginas 26-29. Disponible en: <http://revista.consumer.es/web/es/20040201/pdf/analisis.pdf>

46. TORRES-MORENO, M.; TORRESCASANA, E.; SALAS-SALVADÓ, J.; BLANCH C. 2015. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry* 166, 125-132.
47. SMITH, H.J.; GAFFAN, E.A.; ROGERS, P.J. 2004. Methylxanthines are the psycho-pharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology* 176, 412-419.
48. MUMFORD, G.K.; BENOWITZ, N.L.; EVANS, S.M.; KAMINSKI, B.J.; PRESTON, K.L.; SANNERUD, C.A.; SILVERMAN, K.; GRIFFITHS, R.R. 1996. Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *European Journal of Clinical Pharmacology* 51, 319-325.
49. SRDJENOVIC, B.; DJORDJEVIC-MILIC, V.; GRUJIC, N.; INJAC, R.; LEPOJEVIC, Z. 2008. Simultaneous HPLC Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. *Journal of Chromatographic Science* 46, 144-149.
50. PEREIRA, T.; MALDONADO, J.; LARANJEIRO, M.; COUTINHO, R.; CARDOSO, E.; ANDRADE, I.; CONDE, J. 2014. Central arterial hemodynamics effects of a dark chocolate ingestion in Young healthy people: A randomized and controlled trial. *Cardiology Research and Practice*. Vol 2014, 1-7.
51. PIMENTEL, F.A.; NITZKE, J.A.; KLIPEL, C.B.; DE JONG, E.V. 2010. Chocolate and red wine. A comparison between flavonoids content. *Food chemistry*. Vol. 120, 109-112.
52. EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N.H.; JARDIM, C.D.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N. 2010. Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. *Ciencia Tecnología Alimentaria* 30, 142-150.
53. VINSON, J.A.; MOTISI, M.J. 2015. Polyphenol antioxidants in comercial chocolate bars: Is the label accurate? *Journal of Functional Foods* 12, 526-529.
54. ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M. 2004. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. *Nutrition Research* 24, 695-706.
55. GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M., BERKTAS, I.; ÖZCELİK, B. 2016. Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology* 66, 252-259.
56. VERTUANI, S.; SCALAMBRA, E.; VITTORIO, T.; MALISARDI, G.; BALDISSEOTTO, A.; MANFREDINI, S. 2014. Evaluation of antiradical activity of

- different cocoa and chocolate products-Relation with lipid and protein composition. *Journal of Medicinal Food* 0, 1-5.
57. STOCKHAM, K.; PAIMIN, R.; ORBELL, J.D.; ADORNO, P.; BUDDHADASA, S. 2011. Modes of handling Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) data and reporting values in product labelling. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 686-691.
58. VALENTINA ACIERNO, V.; YENER, S.; ALEWIJNA, M.; BIASIOLI, B.; VAN RUTHA, S. 2016. Factors contributing to the variation in the volatile composition of chocolate: Botanical and geographical origins of the cocoa beans, and brand-related formulation and processing. *Food Research International* 84, 86–95.