UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Estudio del Contenido de Compuestos Bioactivos del Cacao y su Aplicación en la Obtención de un Ingrediente Rico en (Poli)fenoles para el Diseño de un Chocolate Enriquecido

Dª Elena Cienfuegos-Jovellanos Fernández

2016

Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli)fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido

Memoria presentada por la Licenciada en Química Dª Elena Cienfuegos-Jovellanos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Fdo. Elena Cienfuegos-Jovellanos

VºBº
Directora

VºBº
Directora

Mª Jesús Periago Castón

Rocío González Barrio

Dª. Mª Jesús Periago Castón, Catedrática de Universidad del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, y **Dª. Rocío González Barrio**, Investigadora del programa "Juan de la Cierva" adscrita al Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología,

AUTORIZAN,

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **ESTUDIO DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL CACAO Y SU APLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE UN INGREDIENTE RICO EN (POLI)FENOLES PARA EL DISEÑO DE UN CHOCOLATE ENRIQUECIDO**, realizada por **Dª. Elena Cienfuegos-Jovellanos Fernández**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 10 de Noviembre de 2015

Dra. Mª Jesús Periago Castón Dra. Rocío González Barrio

Mi más sincero agradecimiento:

A mis Directoras, Dra. Mª Jesús Periago Castón y Dra. Rocío González Barrio, por el apoyo, compresión, paciencia y continua dedicación que en todo momento me han brindado para que esta Tesis saliera adelante.

Al personal del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por todo lo que ha influido en la consecución de este proyecto y consiguiente Tesis; así como la especial motivación que me han prestado cada uno de ellos para llegar a conseguirlo.

A quienes fueron mis compañeros de trabajo en Natraceutical y que estuvieron involucrados en este Proyecto, con los que pude experimentar y encontrar los datos para llevar a cabo esta Tesis. Al proveerdor de cacao de Natraceutical, quien colaboró en este Proyecto, suministrándonos las muestras correspondientes. A los Directivos de Natraceutical, por sus consejos y por facilitarme todas las posibilidades de las que obtuve un fundamental resultado para el conocimiento y desarrollo de este trabajo. Además, mi agradecimiento a las Empresas y Personal del Sector especializadas en el campo de la alimentación y que estuvieron relacionadas con este Proyecto, con quienes tuve la oportunidad de colaborar, y cuya experiencia científica me ha servido para materializarla.

Y asimismo a mi familia, por el apoyo incondicional, ánimos y preocupación que siempre me han prestado.

A Senén,

A Senén, Guillermo y Claudia

CAPÍTULO 1. Revisión bibliográfica 1

1.1. Alimentos funcionales 3

1.2. (Poli)fenoles del cacao y salud 8

1.3. El cacao como alimento e ingrediente funcional 12

1.3.1. Historia del cultivo y variedades 12

1.3.2. Recolección del grano de cacao y procesado 15

1.3.2.1.Fabricación de polvo de cacao y de chocolate 19

1.3.3. Composición química del cacao 24

1.3.4. Compuestos fenólicos: Influencia del procesado desde el grano hasta el polvo de cacao y chocolate 26

CAPÍTULO 2. Objetivos 33

CAPÍTULO 3. Selección de la materia prima de cacao por su contenido en (poli)fenoles totales: influencia del estadio del grano de cacao, del origen geográfico y del fenotipo. 37

3.1. Introducción y objetivos 39

3.2. Material y métodos 41

3.2.1. Materia prima de cacao 41

3.2.1.1. Estudio del efecto del estadio del grano de cacao 41

3.2.1.2. Estudio del efecto del origen geográfico 44

3.2.1.3. Estudio del efecto del fenotipo de cacao 45

3.2.2. Determinación de la humedad 46

3.2.3. Cuantificación de (poli)fenoles totales 47

3.2.3.1. Preparación de las muestras 47

3.2.3.2. Extracción 47

3.2.3.3. Muestras 48

3.2.3.4. Cuantificación 48

3.2.4. Análisis estadístico 49

3.3. Resultados y discusión 49

3.3.1. Variación del contenido de (poli)fenoles totales según el estadio de la materia prima 49

3.3.2. Variación del contenido de (poli)fenoles totales según el origen geográfico de la materia prima 55

3.3.3. Variación del contenido de (poli)fenoles totales según el fenotipo del grano de cacao 57

3.4. Conclusiones 59

CAPITULO 4. Inactivación de la enzima polifenol oxidasa en grano de cacao .61

4.1. Introducción y objetivos 63

4.2. Material y métodos 66

4.2.1. Inactivación de la enzima PPO en grano de cacao 66

4.2.1.1.Estudio de las condiciones de inactivación de la enzima PPO en grano de cacao y evaluación del grado de melanosis 66

4.2.2. Preparación del grano de cacao con la enzima PPO inactivada. Evaluación de los compuestos (poli)fenólicos en el grano. 68

4.2.2.1. Tratamiento de escaldado del grano 68

4.2.2.2. Preparación de las muestras de cacao 70

4.2.2.2.1. Análisis de (poli)fenoles totales 70

4.2.2.2.2. Análisis de flavanoles en fase reversa por HPLC-DAD 70

4.2.2.3. Determinación de la humedad 72

4.2.2.4. Análisis estadístico 72

4.2.3. Acondicionamiento e infraestructura para el escalado piloto del proceso de escaldado de grano fresco de cacao en el país de origen. Descripción de diferentes modelos 73

4.3. Resultados y discusión 78

4.3.1. Condiciones de inactivación de la enzima PPO en grano fresco. 78

4.3.2. Análisis de (poli)fenoles totales y flavanoles en semillas de cacao con la enzima PPO inactivada secadas y semillas no fermentadas secadas 82

4.3.3. Escalado piloto del proceso de escaldado del grano fresco de cacao 87

4.4. Conclusiones 92

CAPÍTULO 5. Obtención de prototipos de cacao desgrasado en polvo rico en (poli)fenoles 93

5.1. Introducción y objetivos 95

5.2. Material y métodos 97

5.2.1. Preparación de prototipos de cacao en polvo desgrasado a escala de laboratorio 97

5.2.1.1. A partir de semillas de cacao liofilizadas 97

5.2.1.2. A partir de semillas de cacao secadas al sol y en estufa 99

5.2.1.3. A partir de semillas de cacao con la enzima PPO inactivada 100

5.2.2. Preparación de cacao en polvo desgrasado a escala piloto 101

5.2.3. Polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado) 103

5.2.4. Determinación de (poli)fenoles totales 104

5.2.5. Capacidad antioxidante (método ORAC) 104

5.2.6. Análisis de flavanoles por HPLC-DAD 104

5.2.7. Determinación de la humedad 105

5.2.8. Determinación del contenido grado por el método Soxhlet 105

5.3. Resultados y discusión 105

5.3.1. Preparación de prototipos a escala de laboratorio 105

5.3.2. Preparación de un cacao en polvo desgrasado con CO_2 en condiciones supercríticas a escala piloto 109

5.4. Conclusiones 114

CAPÍTULO 6. Desarrollo industrial de un ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles 117

6.1. Introducción y objetivos 119

6.2. Material y métodos 122

6.2.1. Tratamiento térmico alternativo al tostado de un producto intermedio 122

6.2.1.1. Desarrollo industrial de torta de cacao 10-12% de grasa 122

6.2.1.2. Tratamiento de calor de la torta de cacao 10-12% de grasa 123

6.2.2. Diseño y desarrollo industrial del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles 124

6.2.3. Determinación de (poli)fenoles totales 128

6.2.4. Determinación del contenido graso 129

6.2.5. Capacidad antioxidante (método ORAC) 129

6.2.6. Análisis de flavanoles por HPLC-DAD 129

6.2.7. Análisis de procianidinas por HPLC-MS 129

6.2.8. Determinación de la humedad 130

6.2.9. Análisis microbiológico 131

6.2.9.1. Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos 131

6.2.9.2. Enterobacterias 131

6.2.9.3. Mohos y Levaduras 131

6.2.9.4. *E. coli* 132

6.2.9.5. *Salmonella* 132

6.3. Resultados y discusión 133

6.3.1. Tratamiento térmico alternativo al tostado del producto intermedio 133

6.3.1.1. Desarrollo industrial de torta de cacao 10-12% 133

6.3.1.2. Tratamiento con calor húmedo de torta de cacao molida 134

6.3.2. Desarrollo industrial del ingrediente cacao rico en (poli)fenoles 137

6.4. Conclusiones 143

CAPÍTULO 7. Aplicación de un ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles en la elaboración de un chocolate enriquecido 145

7.1. Introducción y objetivos 147

7.2. Material y métodos 150

7.2.1. Preparación de muestras 150

7.2.1.1. Preparación del ingrediente cacao en polvo rico en (poli)fenoles 150

7.2.1.2. Polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado) 151

7.2.1.3. Pasta de cacao 152

7.2.1.4. Preparación del chocolate negro enriquecido con el ingrediente de cacao rico en procianidinas, y chocolate negro no enriquecido (o chocolate estándar) 152

7.2.2. Determinación de flavanoles por HPLC con fase reversa y detección por ultravioleta (HPLC-DAD) 153

7.2.2.1. Preparación de las muestras 153

7.2.2.2. Análisis de flavanoles 153

7.2.3. Determinación de procianidinas (monómeros a decámeros y polímeros) por HPLC en fase normal y detección por fluorescencia (HPLC-FL) 154

7.2.3.1. Desgrasado de las muestras 154

7.2.3.2. Extracción de procianidinas 154

7.2.3.3. Cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia 155

7.2.4. Capacidad antioxidante por el método ORAC 157

7.3. Resultados y discusión 158

7.4. Conclusiones 164

CAPÍTULO 8. Conclusiones generales 167

CAPÍTULO 9. Bibliografía 173

CAPÍTULO 10. Resumen/ Abstract 189

CAPÍTULO 1

Revisión Bibliográfica

1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

En los últimos años ha comenzado a crecer el interés por el consumo de dietas equilibradas que aporten las cantidades de nutrientes esenciales necesarios, para conseguir un estado nutricional adecuado y mantener un estado óptimo de salud. Actualmente, se observa en los consumidores un interés por los efectos beneficiosos de determinados alimentos, considerándose que una forma efectiva de contribuir a la prevención de ciertas enfermedades como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y cáncer, es la promoción de estilos de vida saludable incluyendo una alimentación adecuada. Esta necesidad de contar con alimentos que sean más beneficiosos para la salud, se ve también apoyada con el aumento de la esperanza de vida y el incremento de la longevidad que en los últimos años han experimentado los países desarrollados, aumento de los gastos de asistencia médica, evidencia científica avanzada de que la dieta puede cambiar el predominio y progresión de enfermedades y los cambios en la regulación de alimentos (Anónimo, 1999).

Sin embargo, este hecho no se ve reflejado de forma general en la sociedad, ya que el modo de vida actual de las sociedades modernas y los cambios en los hábitos de vida asociados a las actividades laborales, es uno de los motivos que nos ha llevado a tener malos hábitos nutricionales, debido a la dificultad de seguir las pautas dietéticas recomendadas, compatibles con una dieta equilibrada y saludable.

Hoy en día, la nutrición se orienta a proporcionar alimentos que, además de los nutrientes, contienen otros compuestos biológicamente activos que aportan un beneficio adicional. Son compuestos no nutricionales que se consumen como parte de una dieta normal, que ofrecen beneficios para la salud y contribuyen a reducir el riesgo de sufrir enfermedades. La evidencia científica avala que el consumo regular de estos compuestos bioactivos presenta una asociación positiva con respecto a la disminución del riesgo de desarrollar enfermedades comunes en los países

desarrollados, como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, y otras enfermedades degenerativas (Wu *et al*., 2015; Yamaguchi, 2014; Warri *et al*., 2008; Erdman *et al*., 2007).

A estos compuestos bioactivos de los alimentos se les suele denominar “fitoquimicos” (por encontrarse de forma natural en productos de origen vegetal) como los carotenoides, fitoesteroles, (poli)fenoles, compuestos azufrados como los glucosinolatos, entre otros. Sin embargo, el espectro de compuestos beneficiosos para la salud también incluye microorganismos vivos como los agentes probióticos (bacterias), prebióticos (oligosacáridos), vitaminas, proteínas, péptidos y aminoácidos, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, generalmente de origen marino, el acido linoleico conjugado (CLA), entre otros compuestos que no obedecen estrictamente al termino “fitoquimicos”. De este modo, dentro de este concepto de alimento funcional se enmarcan los alimentos en los cuales ha sido adicionado cualquiera de estos componentes con el objetivo de conseguir un beneficio para la salud.

Hoy en día, no hay consenso acerca de cuál es la definición universal de alimento funcional así, se encuentran una gran variedad de definiciones del término alimento funcional. *Un alimento puede ser considerado funcional si, además de sus cualidades nutricionales afecta beneficiosamente a una o varias funciones relevantes del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar y/o reduce el riesgo de padecer una enfermedad* (Sastre Gallego, 2010). La legislación Europea considera los alimentos funcionales aquellos en los que los compuestos beneficiosos se aportan en el formato de alimento, excluyendo los nutracéuticos, y deben demostrar sus efectos beneficiosos cuando se consumen en cantidades que normalmente forman parte de la dieta (Holm, 2003). La ventaja de incorporarlos en la dieta es que aportan estos compuestos en cantidades tales que su consumo ocasiona un efecto beneficioso, que debe ser demostrado a través de experimentaciones preclínicas y clínicas, en las cuales es posible poner en evidencia los cambios favorables en la salud de los consumidores (Lutz, 2009).

Las múltiples posibilidades de elaboración de alimentos funcionales basadas en el enriquecimiento de un alimento convencional con una gran variedad de ingredientes con actividad biológica, en la eliminación de constituyentes no deseados, en la sustitución de componentes con efectos negativos por otros con efectos beneficiosos, en el incremento de la concentración o biodisponibilidad de un componente natural con efectos positivos, o en la modificación de la biodisponibilidad de otros, hace que la gama de alimentos funcionales comercializados en los últimos años haya aumentado de forma espectacular (Juárez Iglesias, 2010). Los alimentos funcionales pueden ser naturales o procesados; y suelen ser diseñados, formulados o producidos tras la aplicación de distintas tecnologías alimentarias, por lo que encontramos distintos productos y formatos.

Esta situación supone una gran oportunidad para la industria agroalimentaria ante la perspectiva de abrir nuevas líneas de productos de valor añadido y por tanto, nuevos nichos de mercado relacionados con la venta de productos con propiedades saludables que pueden reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Además, el desarrollo industrial hoy en día cuenta con condiciones muy favorables por las nuevas tecnologías para su producción, y los desarrollos tecnológicos en este campo, han sido espectaculares. Sin embargo y como contrapartida, los factores que limitan su desarrollo en el mercado surgen de su clasificación como alimento funcional y su reconocimiento como tal en la legislación alimentaria para su producción y comercialización. Los reglamentos de la Unión Europea regulan el procedimiento de autorización de las alegaciones de salud y de prevención de enfermedad relacionadas con estos alimentos y componentes, a la vez que publican las declaraciones aprobadas, con el objetivo de proporcionarles a los consumidores una información veraz en la etiqueta de los productos.

El Reglamento Europeo sobre declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos, Reglamento (CE) 1924/2006 de 20 de diciembre, estableció un nuevo marco para la comercialización de los alimentos funcionales y etiquetado de las alegaciones de salud y

propiedades nutricionales. Las alegaciones de salud que figuren en el etiquetado, debe estar validada y verificada científicamente lo cual exige realizar una investigación muy rigurosa y costosa que puede limitar su desarrollo. La Unión Europea, tras el informe previo de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, ha establecido que hoy en día existe una falta de base científica sólida para una gran parte de dichos alimentos o ingredientes; por lo que únicamente han sido aprobadas declaraciones nutricionales y de propiedades saludables para aquellos componentes con efectos científicos demostrados, entre los que se incluyen principalmente vitaminas, minerales, algunos ácidos grasos, probióticos del yogur, hidratos de carbono indigestibles, fitosteroles, proteínas, (poli)fenoles del aceite de oliva y algunos productos complejos sustitutos de comidas para el control de peso, entre otros (Reglamento 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas de reducción de riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud en los niños).

La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), ha evaluado tres solicitudes sobre alegaciones saludables; dos de ellas del cacao (*Theobroma cacao L*.) y una tercera de los (poli)fenoles del cacao en particular. Ninguna de las tres ha tenido autorización positiva por parte de la EFSA.

El tipo de alegaciones saludables propuestas y evaluadas fueron:

- Para el Cacao (*Teobroma cacao L.*):

1)-Alegaciones asociadas con el “adelgazamiento y metabolismo lipídico” y el logro de un peso corporal normal como: -control de peso corporal; -ayuda a mantener el adelgazamiento; -contribuye al control de peso corporal; -contribuye al metabolismo graso que ayuda en el control de peso;- ayuda a promover la pérdida de peso. Alegaciones que no han cumplido con la Regulación por las bases de la evidencia científica evaluada (Anónimo, 2009).

2)-Alegaciones asociadas con la “mejora del bienestar emocional” y la mejora del humor como:-mejora del bienestar emocional;-contribuye al humor positivo;-aumenta la relajación. Alegaciones que no han cumplido con la Regulación por las bases de la evidencia científica evaluada (Anónimo, 2011a).

- Para los (poli)fenoles del cacao:

Alegaciones asociadas con la acción antioxidante como: -aseguran una acción antioxidante,-previenen la oxidación del tejido;-ayuda contra la oxidación causada por los radicales libres;-tienen un efecto antioxidante. Alegaciones que no han cumplido con la Regulación por las bases de la evidencia científica evaluada (Anónimo, 2011b).

Para poder hacer las menciones específicas, el alimento o ingrediente funcional debe ser caracterizado, es decir debe existir una metodología analítica que permita identificar y cuantificar el compuesto bioactivo. Además, la sustentación de la alegación de salud debe basarse en estudios experimentales realizados con humanos que demuestren las propiedades saludables a través de biomarcadores de efecto con cambios estadísticamente significativos y de importancia fisiológica (Aggett *et al*., 2005). Es decir, todo mensaje saludable debe basarse en estudios realizados metodológicamente de manera correcta.

Con todo esto, surgen una serie de retos futuros a los que enfrentarse y entre los que destacan:

1- La investigación, el desarrollo y la innovación que conduzcan a mejorar el desarrollo de nuevos alimentos e ingredientes funcionales procesados y aumentar la oferta de productos al consumidor. Asimismo, el avance en el estudio sobre las acciones específicas de interés para la salud, de dichos ingredientes.

2- Estudiar e investigar en la tecnología de obtención de los compuestos bioactivos de los alimentos ya que es determinante de su efectividad biológica.

3- La validación de métodos analíticos y caracterización de los componentes químicos del nuevo alimento o ingrediente funcional.

4- La formulación de productos específicos que satisfagan necesidades nutricionales y de salud así como las expectativas particulares del consumidor.

1.2. (POLI)FENOLES DEL CACAO Y SALUD

El consumo de cacao y sus derivados ha despertado en los últimos años un mayor interés vinculado a sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud. El grano de cacao y los productos que de él se derivan, son ricos en (poli)fenoles. Numerosos estudios epidemiológicos recientes, ponen de manifiesto la asociación entre el consumo de (poli)fenoles en la dieta y la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, los procesos carcinogénicos y, las enfermedades neurodegenerativas (Khan *et al*. 2014; Latham *et al*., 2014; Loffredo *et al*., 2014; Martín *et al.,* 2013; Walters *et al*., 2013; Hooper *et al*., 2012; Goméz-Juaristi *et al*., 2011; Cooper *et al.,* 2008; Shimada *et al*., 2001). Sin embargo, los efectos beneficioso de los (poli)fenoles del cacao, dependen de la cantidad consumida, su biodisponibilidad y de la actividad biológica de los conjugados formados (Roura *et al*., 2007).

La absorción de estos compuestos está influenciada por su estructura química y grado de polimerización (Khan *et al*., 2014); así estudios publicados han evidenciado una mejor absorción de los flavonoides monoméricos y diméricos (catequina, epicatequina y procianidinas) en comparación con otros fenoles más complejos. Por ejemplo, Holt *et al.*

(2002a) mostraron que tras el consumo de 26 g de un cacao rico en flavanoles con 323 mg de monómeros, 256 mg de dímeros y 744 mg de procianidinas oligoméricas, fueron detectadas en plasma humano concentraciones de (-)-epicatequina, (+)-catequina y dímero de procianidina B2, alcanzándose concentraciones máximas entre las 1,5 y 2,5 horas. Asimismo, fue detectado el metabolito de la epicatequina en plasma a las 2 horas de consumo de una bebida de cacao que contenía 54 mg de epicatequina (Roura *et al.,* 2005*).*

Urpí-Sarda *et al.* (2009) fueron los primeros en detectar y cuantificar el dímero de procianidina B2 en muestra de orina humana después del consumo de 40 g de polvo de cacao (conteniendo 0,71, 0,21 y 0,64 mg/g de (-)-epicatequia, (+)-catequina y procianidina B2 respectivamente) en 250 mL de agua.

Sin embargo, las procianidinas oligoméricas y polímeros no son absorbidos a través de la barrera intestinal, pudiendo ser metabolizados por la microbiota intestinal en ácidos fenólicos de bajo peso molecular más biodisponibles y que podrían ser entonces absorbidos a través del colón (Martín *et al*., 2013; Andujar *et al.,* 2012; Tomás Barberán *&* Espín, 2010)*.*

Urpi-Sarda *et al.* (2009) desarrollaron y validaron un método analítico para el análisis de 19 metabolitos fenólicos microbianos y flavanoles monoméricos y dimericos en muestras de orina. Habiéndose demostrado, que algunos de estos metabolitos microbianos procedentes del consumo de cacao, poseen además propiedades biológicas (Monagas *et al*., 2010)

Recientemente, la comunidad científica ha tomado conciencia de que los metabolitos de la microflora representan una gran proporción de la ingesta de (poli)fenoles dietéticos impactando en su biodisponibilidad y exhibiendo algún efecto potencialmente bioactivo (Khan *et al*., 2014).

También, se debe tener en cuenta en la biodisponibilidad de los (poli)fenoles del cacao, la matriz del alimento debido a interacciones directas entre los (poli)fenoles y algunos componentes de los alimentos, como por

ejemplo las proteínas, que pueden tener lugar y afectar la absorción (Serra *et al.,* 2010; Urpi-Sarda *et al*., 2010; Roura *et al*., 2008; Roura *et al*., 2007). Por ejemplo, estudios publicados han mostrado como la presencia de la leche en los productos de cacao, no afecta la absorción y por tanto su posible efecto beneficioso (Roura *et al*., 2007; Schramm *et al*., 2003; Schroeter *et al*., 2003).

Los mecanismos potenciales de actuación de los (poli)fenoles del cacao en las enfermedades cardiovasculares son:

1)- La **inhibición de la oxidación del colesterol LDL**, impidiendo su posterior depósito en las arterias del corazón (Khan *et al*., 2014; Hooper *et al*., 2012; Baba *et al*., 2007; Osakabe *et al*., 2004) En concreto, en un estudio publicado,(Grassi *et al*., 2005;) observaron que el consumo de 100 g de chocolate negro al día (500 mg (poli)fenoles/día y 88 mg catequina y epicatequina/día) producía una disminución del colesterol LDL en individuos hipertensos. Asimismo, (Fraga *et al*., 2005), demostraron que el consumo de 105 g de un chocolate con leche al día (168 mg flavanoles/día; 39 mg monómeros y 126 mg polímeros) disminuía el colesterol total y LDL en jóvenes jugadores de fútbol. En un estudio algo más reciente (Khan *et al*., 2012), publicaron una disminución significantiva de los niveles de oxidación del colesterol LDL y un aumento significativo del colesterol HDL en plasma, tras el consumo de 40 g de un polvo de cacao en 500 mL de leche.

2)- La **disminución de la agregación plaquetaria**, siendo el acontecimiento crítico del inicio de la trombosis coronaria. La capacidad de los flavanoles para reducir la actividad de las plaquetas, explica en parte los efectos beneficiosos de estos compuestos. Se ha publicado que el consumo de cacao rico en flavanoles y procianidinas causa un incremento en el tiempo de coagulación (Holt *et al.*, 2002b; Rein *et al*., 2000), pudiendo contribuir a disminuir el riesgo de trombosis.

3)- **Mejoran la función vascular endotelial**. La ingesta de cacao incrementa la generación de NO (óxido nítrico) que conduce a la vasodilatación y a la reducción de la presión sanguínea (Latham *et al*., 2014; Loffredo *et al*., 2014 Gomez-Juaristi *et al*., 2011). El consumo de una bebida de cacao (100 mL) de alto contenido en flavanoles, (175-185) mg de flavanoles, rápidamente aumentó la concentración de metabolitos del NO, y mejoró la dilatación mediada por flujo (Latham et al., 2014). Asimismo, Taubert *et al*. (2007) mostraron que el consumo de 6 gramos de un chocolate negro al día (30 mg de (poli)fenoles, hasta pentámeros), disminuyen la presión sanguínea. Schroeter *et al*. (2003) mostraron que el consumo de una bebida de cacao preparada disolviendo en 300 mL de agua un polvo de cacao que contenía 900 mg de (poli)fenoles, se asociaba con altos niveles de NO circulante y una mejora de la dilatación mediada por flujo.

4)- **Reducen los marcadores** inflamatorios que afectan la respuesta inflamatoria implicados en la aterosclerosis (Khan *et al.,* 2014; Andújar *et al*., 2012).

5)- Ayudan a **disminuir la presión arterial** (Hooper *et al*., 2012), disminuyendo la presión sistólica y diastólica (Grassi *et al*., 2010; Taubert *et al*., 2007) e incrementando la sensibilidad a la insulina (Fernández-Murga *et al.,* 2011; Grassi *et al*., 2005)

Aunque no existe consenso sobre la cantidad óptima a consumir de estos compuestos, puede sugerirse que el consumo diario de chocolate rico en cacao y (poli)fenoles) es una buena elección para reducir, al menos parcialmente, el riesgo cardiovascular (Gomez-Juaristi *et al*., 2011).

Respecto a la actividad protectora frente al cáncer, se ha demostrado que los (poli)fenoles del cacao han mostrado propiedades antimutagénicas en las fases iniciales e interfieren en las fases de iniciación, promoción y progresión tumoral. Así, la prevención del cáncer por consumo de cacao y sus principales componentes, se ha estudiado en diferentes modelos

animales, incluyendo cáncer de mama, páncreas, de pulmón, tiroides, próstata, leucemia, cáncer de hígado y colon (Martín *et al.,* 2013).

El estrés oxidativo se ha asociado con la pérdida neuronal en las enfermedades neurodegenerativas y durante el declive cognitivo asociado a la edad. Así, Shimada *et al.* (2001) han observado que tanto la catequina, como la epicatequina y las procianidinas B1 y B2 protegen frente a la muerte neuronal inducida en un estudio preclínico. Con lo que estos compuestos podrían utilizarse como agentes protectores frente a la apoptosis neuronal causada por el estrés oxidativo.

1.3. EL CACAO COMO ALIMENTO E INGREDIENTE FUNCIONAL

1.3.1. Historia del cultivo y variedades

Los granos de cacao son las semillas crudas, fermentadas o sin fermentar del árbol del cacao (*Theobroma cacao* L.), planta de la familia *Sterculiaceae* (Esterculiácea). El fruto, que se denomina comúnmente mazorca, está rodeado por un mesocarpio y contiene insertas en una pulpa viscosa de color blanco con el 10–15 % de glucosa y fructosa, entre 20-50 semillas o granos. El fruto mide 15-25 cm de largo por 7-10 cm de grosor. La forma, tamaño y color de la mazorca, atributos de interés en la identificación de clones, varía según el tipo de cacao. El grano exhibe forma oval aplanada, tiene dos centímetros de longitud y un centímetro de anchura y presenta en su sección transversal color blanco, castaño entre claro y gris o violeta pardo hasta violeta profundo (Belitz & Grosch, 1992). Se compone de una parte interior llamada “nib” cubierto por una cáscara externa **(Figura 1.1.)**.

La especie *Theobroma cacao* L. se ha cultivado desde la época precolombina en Centroamérica, aunque se estima que no es nativa de esta región. Su crecimiento y propagación natural se extendió desde la región

Amazonas-Guayana hasta el sur de México, desde donde fue introducida a Venezuela. Desde las primeras exportaciones en el siglo XVI, Venezuela se constituye como el principal proveedor de cacao, primero a México, país al cual se le atribuye haber evidenciado tan importante bebida; luego a España manteniéndose con estas exportaciones el mito de que fue México quien introdujo el consumo de chocolate en el mundo.

La tipificación de los cacaos en todo el mundo corresponde a su relación con Venezuela en cuanto a su cultivo y producción. Así hay tres tipos de cacao, el **cacao Criollo** es el cacao autóctono de Venezuela, el **cacao Forastero** que se corresponde con el cacao de fuera del país procedente principalmente de la cuenca amazónica, y por último el **cacao Trinitario** que se obtuvo del cruce de los cacaos Criollo con Forastero o Amazónico, y que fue realizado en la isla Trinidad, lo que permitió repoblar la zona con cacaos más productivos que el cacao criollo y más resistentes a las enfermedades.

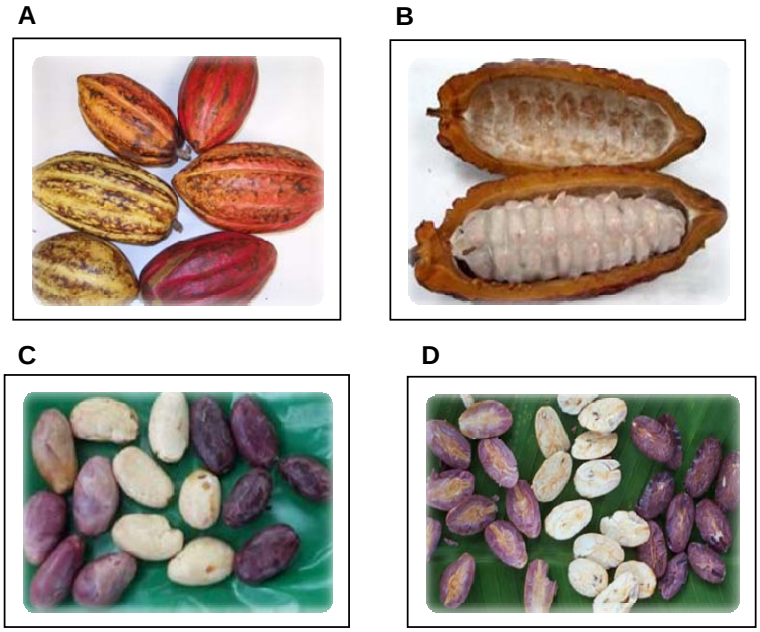


Figura 1.1.

A: Fruto (mazorca) de cacao, **B**: Sección longitudinal de la mazorca de cacao, **C**: Granos de cacao pelados o “nibs” variedad Criollo y Forastero, **D:** Parte interior del grano.

Por otro lado, desde el punto de vista botánico o genético, la especie *Theobroma cacao* L. puede clasificarse en los tres tipos mencionados atendiendo a las siguientes características (Anónimo, 1991):

Cacao Criollo: corresponde a una planta de poco vigor y bajo rendimiento, destacándose la alta calidad de sus semillas. Es cultivado originalmente en las selvas húmedas de México, América Central y el norte de América del Sur. Este tipo de cacao posee un cotiledón de color entre marfil parduzco y castaño muy claro y un olor de cacao dulce. Ejemplos de cacao Criollo son algunos tipos de cacao cultivados en Venezuela, en el Caribe y Nueva Guinea de Papua. Entre ellos tenemos las variedades de cacao Porcelana, el Mérida, el Guasare y el Chuao Original.

Cacao Forastero: se caracteriza por ser de mayor tolerancia a las enfermedades que el cacao Criollo. Es originario de las partes altas de la Cuenca Amazónica, que produce granos de pequeños a medianos (90 a 110 granos por 100 gramos) de cotiledón oscuro. Estas variedades, responsables del mayor volumen de cacao producido y reportado en el mundo, son el Amelonado, el Amazonas e híbridos, así como el subgrupo de Calabacillo o Pará. Conforma el cacao ordinario producido en América, África y Oceanía constituyendo el 80 % de la producción mundial.

Cacao Trinitario: es más resistente y productivo que el cacao Criollo pero de inferior calidad, representa el 15 % de la producción mundial. Es el resultado del cruce entre el cacao Forastero y el Criollo. Es un híbrido que produce ambos tipos de almendras pero con una mayor proporción de almendras color púrpura, debido a su contenido en antocianinas.

Entre los tres tipos de cacao existen claras diferencias en el color de los cotiledones debido a su contenido en antocianinas, pero también hay grandes diferencias de sabor entre ambas variedades al estar dichas antocianinas relacionadas con los sabores más fuertes, más astringentes y robustos. Por ello, el cacao Criollo carente de estos pigmentos, es un cacao por lo general mucho más suave, de donde se produce el cacao de mejor calidad (mayor aroma).

La introducción de materiales forasteros en Venezuela más resistentes y productivos, desmejoró la calidad del cacao y aunque todavía permanece el cacao Criollo de óptima calidad, quedan ya pocas plantaciones de cacao Criollo puro, abundando más las variedades acriolladas (procedentes de varios cruces con otras variedades) que son más productivas. En la actualidad se producen distintos tipos de cacao según las diferentes regiones. Así en la región nororiental se encuentran dos tipos de cacao, el Río Caribe Superior y Río Caribe Natural que son híbridos de cacaos Forasteros con influencia de viejos cacaos Criollos y Trinitarios. En la región norte costera se produce el Carenero Superior, Caracas Natural y Chuao, que son cacaos Trinitarios mezclados con Criollos locales, así como los procedentes de un mosaico de cacaos Forasteros, Trinitarios y Criollos de la región de Chuao. En la región suroccidental las variedades más producidas son el Sur del Lago Clasificado y el Sur del Lago Natural, que son cacaos Criollos y Trinitarios mezclados con híbridos de Criollos (Cartay, 1999). Por tanto, como consecuencia de los diferentes tipos de cruces, en la actualidad se desarrollan diferentes genotipos de cacao dando lugar a una amplia heterogeneidad genética en la materia prima de cacao utilizada en la industria alimentaria.

1.3.2. Recolección del grano de cacao y procesado

La cosecha de cacao se recoge dos veces por año, a mano y con ayuda de herramientas de corte para separar el fruto maduro del árbol. En algunas regiones la recolección se lleva a cabo durante todo el año, sobre todo en los meses de mayo a diciembre. La maduración de la mazorca se percibe principalmente por el color del fruto, presentando los frutos inmaduros color verde y rojo violeta que tras madurar cambian de color; así el color verde pasa a amarillo y el rojo violeta a anaranjado. Tras alcanzar la maduración se cortan y en algunos casos, se guardan los frutos cosechados bajo techo durante un periodo de 5 a 10 días antes de extraer los granos

para que disminuyan los agentes químicos causantes de la astringencia y amargor del cacao así como para aumentar la intensidad del sabor (Afoakwa *et al*., 2012; Nazaruddin *et al*., 2006) **(Figura 1.2.)**.

Los frutos se cortan por la mitad y con cuidado se extraen los granos y se separa la pulpa de la corteza. Los granos con la pulpa adherida se disponen en montón cónico sobre hojas de plátano en cestos o cajones donde se dejan, según el tipo de cacao, durante 2-8 días, para que se produzca la fermentación. Durante la fermentación, la masa de granos es volteada con frecuencia para proporcionar el oxigeno necesario. Las variantes en el proceso de fermentación están relacionadas con las costumbres, prácticas y tradición local. Queda por lo tanto lejos de ser un proceso estandarizado en todo el mundo o incluso dentro de una misma región (Kim *&* Keeney, 1984). Así, en algunos casos se secan las semillas directamente al sol, produciéndose apenas una fermentación.

La fermentación del cacao es un proceso espontáneo que consta de dos etapas: la primera etapa de hidrólisis o fase alcohólica y la segunda etapa de oxidación.

En el primer día de la fermentación, tiene lugar la hidrólisis que se lleva a cabo a temperatura de 40 ºC, y en la que levaduras que se encuentran en la pulpa del fruto, transforman los azúcares del mucílago en alcohol (que posteriormente con la ayuda del oxígeno, se transformará en ácido acético). Enzimas peptinolíticas y otras glicosidasas producen mediante la degradación de los polisacáridos, la licuación de la pulpa de los frutos, que comienza a fluir. Esto facilita el acceso del aire provocando entre el segundo y cuarto día la oxidación (del alcohol hasta el ácido acético por la acción de bacterias acéticas). El pH desciende desde 6,5 hasta aproximadamente 4,5 a la vez que la temperatura aumenta a 45-50 ºC. Entre el quinto y séptimo día, predominan las reacciones de oxidación y condensación de los compuestos fenólicos (Belitz *&* Grosch, 1992).

Durante la etapa de fermentación, disminuye el sabor amargo de la teobromina y se producen aminoácidos, con lo que se generan los compuestos precursores del aroma y sabor característicos del cacao. Una almendra de cacao bien fermentada se caracteriza porque presenta un color café intenso o marrón, es gruesa o hinchada y la cáscara se separa fácilmente. El aroma es agradable y su sabor amargo. Por el contrario, una almendra sin fermentar o mal fermentada presenta un color violáceo en su interior, es aplanada, con la cáscara difícil de separar y un sabor astringente con aroma desagradable. Por tanto, el color violeta es característico de un producto mal fermentado con altos contenido de compuestos (poli)fenólicos y está relacionado con un débil sabor a chocolate (Kattenberg *&* Willemsen, 2003; Belitz *&* Grosch, 1992).

Los granos fermentados se lavan, en algunas ocasiones, para eliminar los restos de mucílago y disminuir los riesgos de contaminación por moho. A continuación se desecan para su almacenamiento hasta reducir el contenido de humedad, la pérdida de agua hincha la cascarilla y por tanto, facilita su desprendimiento posterior. Durante el secado los granos se extienden bajo el sol o se colocan en cobertizos con calor artificial (aire caliente o calentamiento por radiacción IR), pasando de un 55% de humedad a tan solo un 5 o 7% (Kealey *et al*., 1998) **(Figura 1.3.)**.

El proceso de secado depende de las costumbres de cada país y por lo general se lleva a cabo por un tiempo de 6 u 8 días. Tras la desecación y durante el posterior almacenamiento y transporte, las semillas se colocan en sacos, siendo muy importante un control estricto de la humedad. En todo momento se debe mantener por debajo del 7%, ya que por encima del 8%, se favorece la contaminación y crecimiento de mohos (Kim *&* Keeney, 1984; Kealey *et al*., 1998).

Figura 1.2.

Cosecha y desgranado de las mazorcas de cacao.

A **B**

Figura 1.3.

A. Secado del grano de cacao en terrazas**. B.** Secado del grano de cacao en patio.

1.3.2.1. Fabricación de polvo de cacao y de chocolate.

La primera operación del proceso de elaboración de cacao es la limpieza del grano, donde se separan las piedras, alambres, astillas y polvo que acompañan al cacao. A continuación, tiene lugar el descascarillado donde se separa el “nib” de la cáscara (que constituye la cubierta exterior de la semilla o grano). Generalmente, este proceso tiene lugar en dos fases, una primera donde se separa por tamaños la mezcla “nibs”/cascarilla mediante la utilización de una criba; y una segunda fase de arrastre por aspiración, que consiste en separar la cascarilla más ligera del “nib”. De esta manera quedan los “nib” disponibles para la siguiente fase de tostado. No obstante, existe una variante importante de este proceso, y es el tostado previo del grano junto con su cáscara, y después, se procede con la eliminación de la cascarilla.

El tostado es la operación esencial donde se elimina la humedad y tiene lugar un conjunto de reacciones químicas en las cuales intervienen los compuestos precursores desarrollados en la fermentación y secado y que

dan lugar al desarrollo del aroma y sabor característico del cacao. El grado de tostado del cacao depende de la relación tiempo/temperatura, donde el tiempo puede variar desde los 5 a 120 minutos y la temperatura desde 120 ºC a 150 ºC (Wollgast & Anklam, 2000).

Cualquiera que sea la técnica de tostado utilizada, durante el tratamiento térmico se producen compuestos derivados de las reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos, conocidas comúnmente como las reacciones de Maillard o pardeamiento no enzimático. Estas reacciones generan una variedad de productos, intermediarios y pigmentos marrones (melanoidinas), los cuales contribuyen a la actividad antioxidante, sabor y color del grano tostado. Entre estos compuestos se encuentran alcoholes, tiazoles, pironas, ácidos, esteres, aldehídos, iminas, aminas, oxazoles, pirazinas y pirroles. Sin embargo, el buen sabor y aroma depende mucho de la variedad de cacao del grano empleado y de la manera como se realizó el proceso de fermentación y secado. Por ello, los tipos de cacao selectos de mayor calidad, como el cacao Criollo, se tuestan más débilmente para conservar mejor su aroma original, que los tipos de cacao más corrientes.

Después de tostados, los “nibs” de cacao se muelen para producir el licor o pasta de cacao, masa homogénea y maleable cuya fluidez se debe a la ruptura de las paredes celulares y a que las partículas de cacao se encuentran suspendidas en la manteca de cacao fundida. La pasta de cacao pasa a prensas, etapa en la que se separa la grasa de la masa de cacao hasta el porcentaje deseado. Esta operación se realiza en prensas hidráulicas que funcionan con una presión de 900 kg/cm^2. La pasta se calienta a 90-100 ºC y la manteca de cacao que fluye del filtro-prensa, se limpia, se moldea y refrigera, y se emplea posteriormente para la fabricación de chocolate. El residuo que se genera en este proceso constituye la torta de cacao, y contiene entre un 10-24 % de grasa, ya que el fabricante controla la cantidad de manteca que se extrae del licor o pasta de cacao, dejando una torta de cacao con un mayor o menor contenido de grasa en función de sus aplicaciones posteriores. Una vez enfriada la torta de cacao se muele y se tamiza obteniéndose el polvo de cacao (Belitz & Grosch, 1992) **(Figura 1.4.)**.

Los diferentes tipos de chocolate que existen en el mercado, como son el chocolate negro, el chocolate con leche y el chocolate blanco, se fabrican utilizando una serie de ingredientes básicos como son: la pasta de cacao, manteca de cacao, azúcar, emulsionante como la lecitina y aromatizante como la vainilla. Las diferencias entre los distintos tipos de chocolate se obtienen modificando las proporciones entre sus componentes y añadiendo otros productos a la composición básica. Así, el chocolate negro es un producto que se obtiene a partir de licor o pasta de cacao que contiene el 55 % de manteca de cacao, sacarosa y manteca de cacao adicional; mientras que el chocolate con leche, contiene leche en polvo como ingrediente disminuyendo la proporción de cacao (Fernádez-Murga *et al*., 2011).

La elaboración de chocolate implica distintas etapas**:** mezclar/amasar, refinar, conchado, templado y moldeado. En la primera etapa se mezclan los ingredientes, el licor de cacao, azúcar, manteca de cacao y/o leche en polvo, en un procedimiento de amasado. A continuación se procede al refinado, que consiste en moler la mezcla resultante del amasado, para obtener una pasta fluida y suave de chocolate. Es posible controlar la textura mediante la elección del tamaño de partícula del azúcar, el contenido en grasa y/o la adición de emulsionantes. Un ingrediente añadido frecuentemente es la lecitina, un emulsionante que mejora las propiedades de fluidez del chocolate y por tanto, permite que se reduzca la cantidad de manteca de cacao. Para impedir que el chocolate se espese absorbiendo humedad y mantener un chocolate fluido de cubrimiento uniforme, suelen utilizarse de 0.5 al 1 % de lecitina (Kealey *et al*., 1998).

Después, se somete al procedimiento de conchado, momento en el que la mezcla de chocolate se trabaja mecánicamente para darle al chocolate un aroma más completo, homogéneo y con características reológicas mejoradas. Esto se realiza normalmente a temperaturas que oscilan entre 75 ºC y 80 ºC para el chocolate negro, y aproximadamente a 65 ºC para chocolates blanco y con leche. Otros componentes tales como

los aromatizantes (por ejemplo vainilla) y la manteca de cacao extra, pueden añadirse en esta etapa si es necesario (Liendo, 2005).

Posteriormente al conchado, tenemos la etapa denomina templado en la que se enfría el chocolate líquido hasta una temperatura por debajo de su temperatura de solidificación, y entonces se vuelve a calentar para formar la estructura cristalina grasa apropiada para facilitar la cristalización rápida de su contenido en grasas en el enfriamiento.

Después de templar el chocolate, se somete a un proceso de moldeado que le proporcionará la forma definitiva en la que va a ser comercializado, bien para destino del consumidor final o para su usos en la industria de confitería (**Figura 1.4.**).

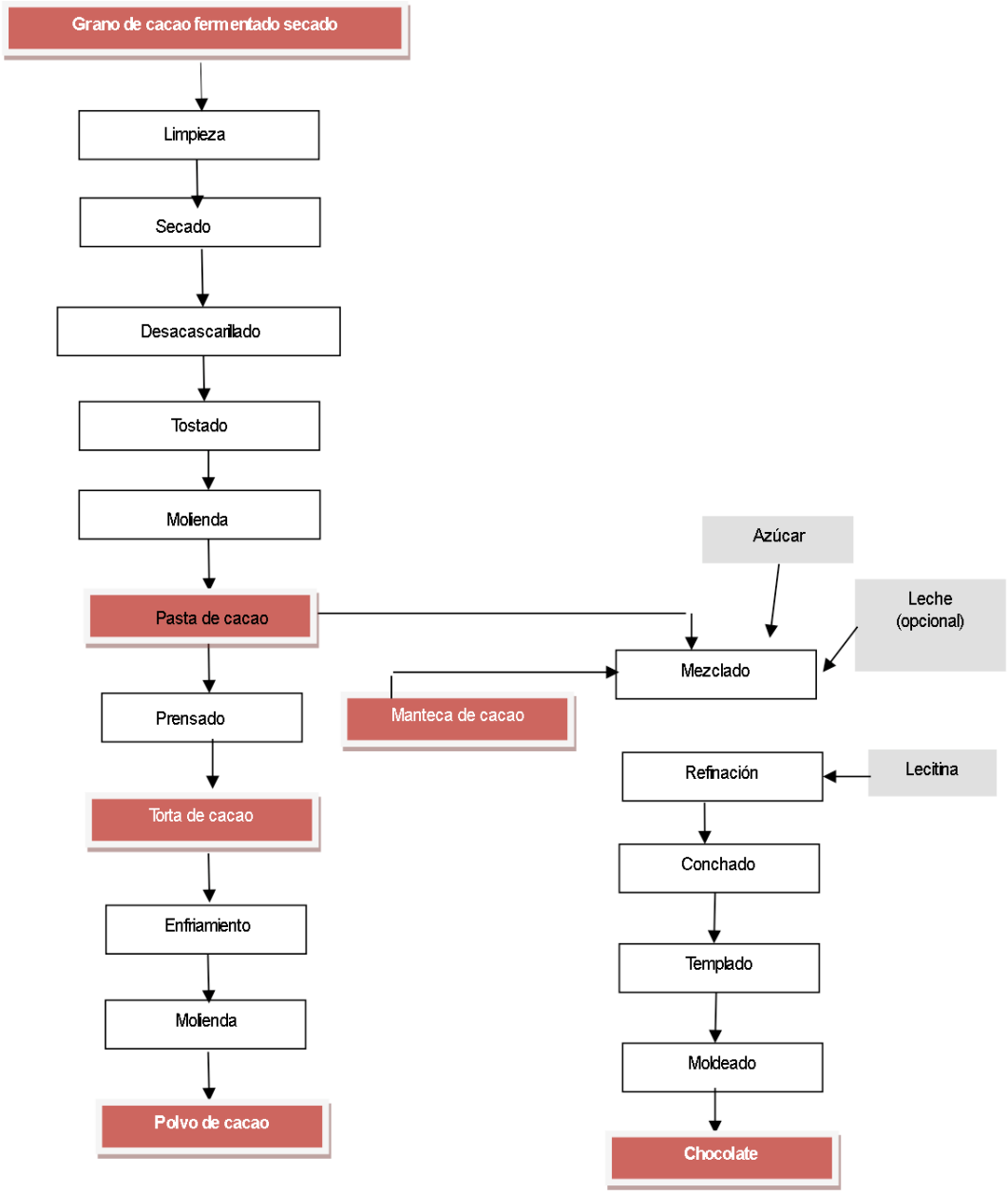


Figura 1. 4.

Diagrama de elaboración de polvo de cacao, chocolate y subproductos.

1.3.3. Composición química del cacao

La semillas de cacao son una buena fuente de elementos minerales, lípidos, compuestos (poli)fenólicos, ácidos grasos y ácidos (Serra & Ventura, 1999), aunque su valor nutritivo depende principalmente del tipo de producto que se elabore con el cacao como ingrediente principal, así como de los demás ingredientes que contengan. Tal es el caso del chocolate con leche, donde su valor nutritivo está incrementado por el aporte proteico de las proteínas de la leche. Este hecho hace que la composición química varíe significativamente entre los distintos alimentos elaborados a base de cacao que se encuentran disponibles en el mercado.

A continuación se detallan las características de los principios inmediatos que encontramos habitualmente en el cacao así como los presentes en la semilla de cacao:

Lípidos: La manteca de cacao es la grasa de las semillas de cacao, es responsable de las propiedades de fusión del chocolate y representa entre el 50 y 57% en peso seco del grano de cacao. Los ácidos grasos predominantes en la manteca son saturados (35% esteárico y 25% palmítico) y monoinsaturados (35% oleico); con un 3% poliinsaturado (linoleico) (Steinberg *et al*., 2003).

Carbohidratos: La pulpa del grano fresco de cacao es rica en glucosa, fructosa y sacarosa con un contenido total del 10-15% (Aikpokpodion & Dongo, 2010). También, como carbohidratos solubles se han evidenciado estaquiosa, rafinosa y galactosa. Si la etapa de fermentación se lleva a cabo de forma correcta, la sacarosa desaparece en su totalidad y se incrementan las cantidades de glucosa y fructosa. Estos azúcares reductores, desempeñan un papel importante en la producción del aroma durante el tostado (Belitz & Grosch, 1992); al combinarse con los grupos amino mediante las reacciones de Maillard o pardeamiento no enzimático para dar las pirazinas responsables de dicho aroma.

El porcentaje de almidón presente en granos de cacao fermentados y secados es del 6%. Además, la cáscara del grano de cacao representa una buena fuente de fibra, donde el contenido de fibra dietética total es del 40% y está constituida por diversos tipos de polisacáridos entre los que están los de carácter péctinolitico (45%), las celulosas (35%) y las hemicelulosas (20%) (Redgwell *et al*., 2003).

Proteínas: Son el segundo componente más abundante del grano de cacao y suponen un 17,5%; incluyen la albúmina, globulina, prolaminas y glutelina (Jumnongpon *et al*., 2012). Cambios en la composición de proteínas durante la fermentación y tostado de los granos de cacao han sido descritos (de Brito *et al.,* 2000). Como consecuencia de la fermentación del cacao, se reduce la cantidad de proteína total, produciéndose una hidrólisis de las mismas que da lugar a la liberación y por tanto un aumento de péptidos y aminoácidos libres. Durante el tostado, también se produce una disminución de la fracción de albúmina, proteína total y aminoácidos libres.

Asimismo, ha sido publicado que la presencia de (poli)fenoles reduce la formación del aroma durante el tostado de las semillas de cacao y por tanto la reacción de Maillard, lo cual limita las oportunidades para explorar la química de la reacción de Maillard (Jumnongpon *et al*., 2012).

Cuando la concentración de (poli)fenoles aumenta, la formación de pirazina disminuye debido al enlace entre los (poli)fenoles con los precursores de la pirazina (aminoácidos libres, azucares reductores y pirazinas) formados durante el tostado (Misnawi *et al*., 2004).

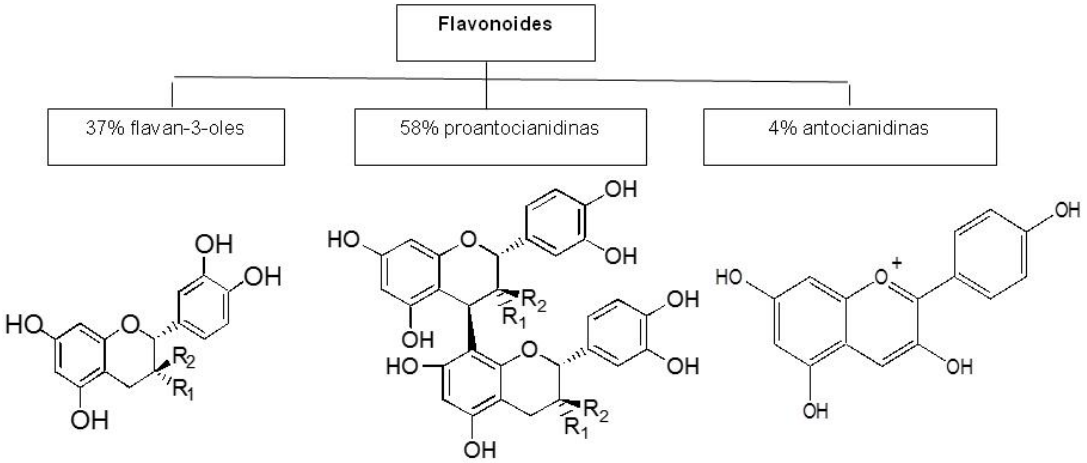
Teobromina y Cafeína: La teobromina es el principal alcaloide del cacao y se halla en los granos, siendo el contenido de la misma en los granos de cacao fermentados y en la cáscara de un 1.2% y un 1.4% respectivamente
Conforme a estos datos, se observa que el mayor porcentaje de teobromina se encuentra en la cáscara de cacao, lo cual se debe a que parte de la misma pasa a la cáscara tras liberase del grano durante la fermentación.

Además de teobromina existe cafeína en cuantía muy excasa (media del 0,2%) (Belitz & Grosch, 1992).

1.3.4. Compuestos fenólicos: Influencia del procesado desde el grano hasta el polvo de cacao y chocolate

Las semillas o granos frescos de cacao obtenidos de la mazorca son excepcionalmente ricas en compuestos (poli)fenólicos, su fracción (poli)fenólica está compuesta por:

- 37% de catequinas o flavan-3-oles, siendo la (-)-epicatequina la catequina más importantes dentro de su grupo; además se han identificado en cantidades más bajas (+)- catequina y trazas de (+)- galocatequina y (-)-epigalocatequina.
- 58% de proantocianidinas oligoméricas, principalemente los dimeros B1, B2, B3, B4, trímero (C1) y tetrámero (D) (Khan *et al.,* 2014).
- 4% de antocianos, siendo estos últimos los responsables de la coloración púrpura de las semillas. La fracción de antocianidinas está formada preferentemente por el cianidin-3-α-L-arabinósido y cianidin–3-β–D-galactósido.
- Aunque en menores cantidades, también están presentes en cacao los flavonoles quercetina y quercetin-3-*O*-glucósido (isoquercitrina), quercetin-3-*O*-galactósido (hiperósido), quercetin-3-*O*-arabinósido y las flavonas apigenina, apigenina-8-*C*-glucósido (vitexina), luteolina y luteolina-7-*O*-glucósido, naringenina, clovamida y ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ácido ferulico, ácido galico y ácido *p*-coumarico (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005; Sanchez-Rabaneda *et al.*, 2003).



(-)-epicatequina R_1 = OH; R_2 = H procianidina B1= epicatequina-(4β 8)-catequina

(+)-catequina R_1 = H; R_2 = OH procianidina B2= epicatequina-(4β 8)-epicatequina

Figura 1.5.

Estructura química de la (-)-epicatequina, (+)-catequina, procianidina B1, procianidina B2 y antocianidinas.

El cacao es de todos los alimentos el que posee el contenido más alto de flavanoles por peso, y por tanto, un contribuyente significativo a la ingesta dietética total de flavonoides (Khan *et al.,* 2014). Así, el contenido de (poli)fenoles de semillas de cacao es de un 6% (semillas con un contenido graso del 54% y un 6% de humedad) (Wollgast & Anklam, 2000).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque la materia prima de cacao tenga una gran cantidad de (poli)fenoles, no implica necesariamente un elevado contenido en el producto final elaborado debido a las pérdidas que se producen durante las etapas de procesado. Así, este contenido de (poli)fenoles en semillas depende de varios factores como son la **variedad del grano** (genotipo) y **origen** (Bordiga *et al.,* 2015; Zapata *et al.,* 2015; Khan *et al.,* 2014; Andújar *et al*., 2012; Othman *et al.,* 2010; Rojas *et al.,* 2008; Othman *et al.,* 2007; Niemank *et al.,* 2006; Kim & Keeney, 1984); condiciones de tratamiento del grano posterior a su recolección

(**tratamientos post-cosecha**), como por ejemplo el tiempo de almacenamiento de las mazorcas durante la prefermentación y, del nivel de **fermentación** del grano (Afoakwa *et al*., 2015; Di Mattia *et al.,* 2013; Afoakwa *et al.,* 2012; Mazor Jolic *et al*., 2011; Nazaruddin *et al.,* 2006).

Con relación a los tratamientos post-cosecha del grano de cacao, Afoakwa *et al.* (2012) observaron una reducción en el contenido de (poli)fenoles totales, *o*-difenoles y antocianinas con el aumento del tiempo de almacenamiento de las mazorcas y fermentación; comprobando que tiempos de almacenamiento de mazorcas de cacao por encima de los siete días, conducían a una reducción drástica del contenido de (poli)fenoles en semillas de cacao fermentadas. Así, el método de almacenamiento de las mazorcas previo a su fermentación, da lugar a una reducción en el volumen de pulpa que facilita la oxidación y posterior polimerización de la (-)-epicatequina y los productos de oxidación (Hii *et al*., 2009a).

La fermentación del grano de cacao, es uno de los factores que más afecta al contenido de (poli)fenoles en las semillas, ya que se producen cambios químicos que conducen a un descenso notable de los mismos. Las intensas modificaciones que sufren, se inician después de la muerte de las semillas, cuando las sustancias fenólicas y enzimas son liberadas de sus respectivas zonas de almacenamiento en la célula. Los (poli)fenoles se propagan desde sus células almacenadoras al líquido de drenaje. Desde el primer día de la fermentación, la pulpa adherida a las semillas, empieza a convertirse en un líquido que comienza ser drenado. Bajo condiciones anaeróbicas, los micro-organismos comienzan a producir ácido acético y etanol. La muerte ocurre durante el segundo día, siendo los principales factores que contribuyen el ácido acético producido por la pulpa y las altas temperaturas que se llegan a alcanzar (entre 45-50 ºC). Como resultado de esta fase anaeróbica se producen reacciones de hidrólisis enzimáticas; las antocianinas son hidrolizadas debido a la acción de enzimas glucosidasas a antocianidinas libres, que son oxidadas a quinonas y polimerizan con catequinas para formar taninos complejos; resultando en la pérdida de la coloración violeta de los cotiledones. Las antocianinas desaparecen

rápidamente durante el proceso de fermentación, estimándose un 93% de pérdidas después de 4 días de fermentación (Wollgast *&* Anklam, 2000).

Después del segundo día, comienza a tener lugar la segunda fase de la fermentación, la fermentación aeróbica. Kattenberg *&* Willemsen (2003) mostraron que en el cambio de las condiciones anaeróbicas a las aeróbicas, se producía una reducción en el nivel de (poli)fenoles que era mostrado por la disminución del valor de TEAC (capacidad antioxidante equivalente).

Durante esta fase aeróbica, la enzima polifenol oxidasa (PPO) actúa primero oxidando a *o*-quinonas a la mayor parte de los (poli)fenoles (epicatequinas, catequinas y antocianidinas), que pueden reaccionar con aminoácidos y proteínas o polimerizar con otros flavonoides teniendo lugar la formación de taninos complejos de elevado peso molecular. Taninos que forman complejos con proteínas a través de puentes de hidrogeno siendo el resultado de esta reacción la formación de pigmentos, insolubles en agua, de color marrón. De esta forma, el contenido de epicatequinas y (poli)fenoles solubles es reducido aproximadamente a un 10 y 20% respectivamente de su valor inicial (Wollgast *&* Anklam, 2000).

Kim *&* Keeney, (1984) publicaron una fuerte disminución en la concentración de epicatequina entre el segundo y el tercer día de fermentación.

Kealey *et al*. (1998) mostraron una correlación negativa del contenido de procianidinas (monómeros a decameros) con el grado de fermentación y con el cambio de color del grano desde violeta fuerte a ligeramente morado y marrón, mostrando un descenso general entre el 30 y 60% de las procianidinas.

Caligiani *et al*. (2007) estudiaron también la correlación entre el contenido (poli)fenoles con el grado de fermentación en semillas de Ecuador; y publicaron que el contenido de (poli)fenoles y (-)-epicatequina era más bajo en semillas más fermentadas (color marrón más oscuro). Aikpokpodion *&* Dongo, (2010) publicaron una disminución del contenido de (poli)fenoles

totales y (-)-epicatequina en semillas al aumentar los días de fermentación; mostrando un descenso en la concentración de (poli)fenoles desde el 16 al 6% después de 6 días de fermentación. Afoakwa *et al.* (2015) publicaron una reducción del 30% de (poli)fenoles totales, 32% *o*-difenoles y 35% de antocianinas, después de 10 días de almacenamiento de mazorcas de cacao, en semillas fermentadas y secadas.

Por tanto, el resultado de la fermentación es la aparición de pigmentos de color marrón insolubles en agua en granos de cacao; color que está relacionado con su contenido inicial de (poli)fenoles y pardeamiento enzimático catalizado por la enzima polifenol oxidasa (Misnawi *et al*., 2003).

Durante la etapa de **secado** del grano se producen también pérdidas de (poli)fenoles debidas a reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático a partir de la polimerización de la quinona. En esta etapa, la enzima PPO aunque con una actividad mucho más reducida, continúa actuando ya que con el incremento de pH y la elevada captación de oxigeno, se producen las condiciones apropiadas para la oxidación de los fenoles (Di Mattia *et al*., 2013; Hii *et al.,* 2009b; Kyi *et al.,* 2005; de Brito *et al.,* 2002;).

Se ha demostrado que ésta enzima es fuertemente inactivada durante el primer día de la fermentación, permaneciendo un 50 y un 6% de su actividad después de 1 y 2 días respectivamente (Hii *et al*., 2009a). Asimismo, ha sido demostrado que dos días de secado al sol de semillas no fermentadas, ocasionaba una disminución del 50% del contenido de epicatequina. Por ello, para investigar el contenido de epicatequina en granos frescos de cacao, estos deben de ser inmediatamente liofilizados una vez son sacadas los granos de la mazorca (Wollgast *&* Anklam, 2000). En este sentido, la liofilización del grano ha mostrado ser el método de secado capaz de retener la mayor parte de los (poli)fenoles, mientras que el secado al sol, el método que ha mostrado el contenido más bajo debido al largo proceso de secado (Hii *et al*., 2009b).

Asimismo, todas las operaciones que conllevan la fabricación del polvo de cacao y chocolate, principalmente el **tostado** (Afoakwa *et al*., 2015;

Bordiga *et al.*, 2015; Zapata *et al.*, 2015; Mazor Jolic *et al*., 2011; Payne *et al*., 2010) , **desgrasado**, **molienda**, **alcalinizado** y **conchado**, y que son el resultado de exposición a altas temperaturas o calor por tiempos prolongados, producen cambios en la composición y disminución del contenido (poli)fenoles (Bordiga *et al*., 2015; Afoakwa *et al.,* 2015; Di Mattia *et al*., 2014; Khan *et al*., 2014; Crozier *et al*., 2011; Mazor Jolic *et al.,* 2011; Payne *et al*., 2010; Andrés-Lacueva *et al.,* 2008; Miller *et al*., 2008; Caligiani *et al*., 2007; Kowalska *&* Sidorczuk, 2007; Wollgast *&* Anklam 2000; Kealey *et al*., 1998;).

La etapa de **tostado** da lugar a una reducción considerable del contenido de (poli)fenoles totales debido a las altas temperaturas que se emplean que hacen que estos compuestos reaccionen con los aminoácidos e hidrolizados proteicos produciéndose cambios químicos que afectan principalmente a las características sensoriales del chocolate (Lee *et al*., 2001).

Así, Payne *et al*. (2010) afirmaron que durante el tostado a 120 ºC se produjeron pérdidas de (-)-epicatequina mientras que la (+)-catequina aumentó debido a la epimerización de la (-)-epicatequina. Mazor Jolic *et al*. (2011), observaron que el proceso de tostado producía una pérdida del 14% del contenido de fenoles totales. Bordiga *et al*. (2015) destacaron la importancia de la optimización de los parámetros del proceso de tostado para limitar la oxidación de la fracción fenólica. De hecho, junto con el desarrollo de la reacción de Maillard, la oxidación de compuestos fenólicos así como su participación en algunas reacciones químicas como la formación de complejos de moléculas de elevado peso molecular, significativamente reducen su contenido también influenciando la capacidad antioxidante.

Estos cambios en el contenido de (poli)fenoles totales y antocianinas durante los tratamientos post-cosecha del grano de cacao, dictaminan los niveles de astringencia, amargor y color desarrollado en los productos finales de cacao y chocolate.

CAPÍTULO 2

Objetivos

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido desarrollar y obtener un ingrediente natural de cacao con un alto contenido en (poli)fenoles y con una alta capacidad antioxidante, y que pueda ser apto como ingrediente para su aplicación en productos alimenticios.

Para la consecución del objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos, que se corresponden con los distintos capítulos de resultados y discusión:

1. Seleccionar granos de cacao con un alto contenido de (poli)fenoles para asegurar una alta concentración de estos compuestos bioactivos en las etapas posteriores de procesado.

2. Determinar las condiciones más adecuadas de escaldado para la inactivación de la enzima polifenol oxidasa en el grano fresco de cacao y el tipo de proceso a escala piloto, evaluando el efecto de la inactivación de la enzima sobre el contenido de (poli)fenoles totales y flavanoles, comparando las semillas con la enzima inactivada respecto a las semillas no fermentadas.

3. Estudiar, a escala de laboratorio, distintos procesos tecnológicos con la finalidad de obtener un prototipo de cacao desgrasado, evaluando el efecto de estos procesos sobre el contenido de (poli)fenoles y el contenido de grasa residual. Seleccionar el proceso más adecuado y evaluar su efecto sobre el contenido de flavanoles y la capacidad antioxidante del cacao en polvo desgrasado.

4. Evaluar los efectos de un tratamiento térmico, alternativo al tostado, en el contenido de (poli)fenoles totales y el contenido en flavanoles de la torta de cacao desgrasada para la obtención industrial de un ingrediente rico en (poli)fenoles.

5. Diseñar una formulación de un chocolate negro enriquecido con un ingrediente de cacao en polvo con alto contenido en (poli)fenoles y procianidinas, y caracterizar su perfil (poli)fenólico así como evaluar su capacidad antioxidante, comparándolo con un chocolate negro no enriquecido, elaborado con las mismas proporciones de ingredientes.

Estos objetivos específicos han sido desarrollados de forma más detallada en cada unos de los capítulos correspondientes (capítulos del 3 al 7).

CAPÍTULO 3

Selección de la materia prima de cacao por su contenido en (poli)fenoles totales:

Influencia del estadio del grano de cacao, del origen geográfico y del fenotipo.

3.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha revelan que el grano de cacao así como sus derivados (polvo de cacao, chocolate, bebidas en base cacao…) son productos ricos en un tipo de compuestos antioxidantes; los (poli)fenoles. La bibliografía que existe sobre este tipo de compuestos antioxidantes y su actividad biológica es extensísima, ya que son sustancias muy conocidas por su amplia distribución en frutas y vegetales.

Datos bibliográficos recogidos sobre el contenido de (poli)fenoles en sólidos de cacao secos y desgrasados procedentes de semillas de cacao frescas y no fermentadas, revelan que están entre un 15 y un 20%, cantidad aproximadamente equivalente a un 6% de (poli)fenoles en semillas de cacao secadas hasta un contenido en humedad del 6% y con un contenido en grasa del 54%, (Wollgast *&* Anklam, 2000). No obstante, a parte de este contenido original se debe tener en cuenta todos aquellos factores que afectan de forma significativa a dicho contenido y, como sucede en el caso del cacao, hacen que en el producto final elaborado dichos compuestos bien disminuyan o bien se pierdan (Bordiga *et al*., 2015; Kattenberg *&* Willemsen, 2003).

Como ya se detalló en el **Capítulo 1**, en el caso del grano de cacao este contenido de (poli)fenoles puede variar según el origen y la variedad botánica del cacao (Bordiga *et al.,* 2015; Zapata *et al.,* 2015; Khan *et al.,* 2014; Andújar *et al*., 2012; Othman *et al.,* 2010; Rojas *et al.,* 2008; Othman *et al.,* 2007; Niemank *et al.,* 2006; Kim *&* Keeney, 1984), así como de las condiciones de tratamiento posterior a su recolección. Diversos autores han descrito que el almacenamiento de las mazorcas (Afoakwa *et al*., 2015; Afoakwa *et al*., 2012; Nazaruddin *et al*., 2006), el nivel de fermentación del grano (Di Mattía *et al*., 2013; Mazor Jolic *et al*., 2011; Aikpokpodion *&* Dongo, 2010; Caligiani *et al*., 2007; Kattenberg *&* Willemsen, 2003; Wollgast *&* Anklam, 2000; Kealey *et al*., 1998; Kim *&* Keeney, 1984) y el proceso de secado para su posterior almacenamiento (Di Mattía *et al*., 2013; Hii *et al*.,

2009a; Kyi *et al*., 2005; De Brito *et al.,* 2002; Wollgast *&* Anklam, 2000) afecta, en mayor o menor medida, al contenido de estos compuestos. Asimismo, todos los procesos tecnológicos que conllevan la fabricación del polvo de cacao y chocolate, principalmente el tostado, desgrasado y alcalinizado, molienda y conchado, disminuyen el contenido y producen cambios en la composición de los (poli)fenoles (Afoakwa *et al.,* 2015; Bordiga *et al*., 2015; Zapata *et al*., 2015; Di Mattía *et al*., 2014; Khan *et al*., 2014; Crozier *et al*., 2011; Mazor Jolic *et al*., 2011; Payne *et al*., 2010; Andrés-Lacueva *et al.,* 2008; Miller *et al*., 2008; Caligiani *et al*., 2007; Kowalska *&* Sidorczuk, 2007; Wollgast *&* Anklam, 2000; Kealey *et al*., 1998). En total, durante el proceso de elaboración del cacao, el contenido de (poli)fenoles se reduce más de diez veces (Khan *et al*., 2014).

A lo largo de la fermentación del cacao el contenido de epicatequinas es reducido teniendo lugar la formación de taninos complejos por condensación. Por otro lado, las antocianinas (responsables del desarrollo característico del color púrpura del grano) son hidrolizadas por la acción de las enzimas glicosídicas. Con una actividad mucho más reducida, el proceso de secado del grano de cacao también conduce a pérdidas de flavonoides. Igualmente la etapa de tostado da lugar a una reducción considerable del contenido de estos compuestos debido a las altas temperaturas que se emplean y que conducen a notables pérdidas de los mismos (Wollgast *&* Anklam, 2000). No obstante, el control y optimización de estos procesos tecnológicos puede disminuir la pérdida de estos compuestos en productos semielaborados y finales para obtener un cacao de alto valor añadido (Bordiga et al., 2015; Khan *et al*., 2014; Kowalska *&* Sidorczuk, 2007). En este sentido, Kealey *et al*. (1998) llegaron a la conclusión de que la principal forma de conservar el contenido de (poli)fenoles en derivados de cacao o chocolate, era seleccionando semillas de cacao ricas en (poli)fenoles con baja fermentación así como reduciendo el tiempo y la temperatura de los tratamientos de calor, como por ejemplo, en el proceso de tostado.

Por lo tanto mejorar y controlar cada uno de estos procesos con el fin de incrementar el porcentaje de (poli)fenoles en el producto de cacao final elaborado, resulta actualmente de gran interés por la industria alimentaria, ya que dicho contenido va a estar relacionado directamente con las propiedades beneficiosas del cacao.

Así, teniendo en cuenta todas estas consideraciones, es de suma importancia que en la selección del tipo de cacao, se consiga el perseguir unas determinadas concentraciones de (poli)fenoles iniciales, de modo que sirva como material de partida para obtener un concentrado de antioxidantes que se pueda incorporar a los productos derivados del cacao.

En este sentido, el objetivo de este trabajo ha sido seleccionar un cacao con alto contenido de (poli)fenoles para asegurar la mayor concentración de los mismos en las etapas posteriores de procesado. Para ello se ha investigado el contenido de (poli)fenoles totales en función del (i) estadio del grano de cacao, (ii) el origen de producción y variedad de cacao y (iii) el fenotipo del grano para una misma variedad de cacao.

3.2. MATERIAL Y METODOS

3.2.1. Materia prima de cacao.

3.2.1.1. Estudio del efecto del estadio del grano de cacao.

Para el estudio se eligieron muestras de grano fresco (procedentes del fruto o mazorca), muestras de semillas no fermentadas secadas al sol y muestras de semillas fermentadas secadas al sol de Costa de Marfil (de la región de Daloa y Alepe), Guinea Ecuatorial (del Norte y Sur del país), República Dominicana (Altagracia), Perú y Venezuela (región nororiental de Rio Caribe y norcentral costera de Chuao) **(Tabla 3.1.)**.

Las muestras de semillas fueron suministradas en diferentes periodos por proveedores de cacao de cada país, siendo identificado cada envío con un código de muestra diferente, correspondiente a un lote.

Las mazorcas o frutos de cacao, fueron abiertas y desgranadas en el laboratorio separándose la pulpa de las semillas frescas. Las muestras de semilla fresca fueron congeladas en bolsas de plástico de aproximadamente 100 gramos de peso. Los lotes recibidos de semillas no fermentadas y semillas fermentadas secadas al sol, fueron directamente guardados a temperatura ambiente y en la oscuridad. Una parte de las semillas no fermentadas y de las semillas fermentadas secadas al sol, se tostaron con la cáscara en estufa a 150 ºC durante 30 minutos **(Figura 3.1.)**. Cada lote de semilla de cacao fue clasificado según el estadio del grano e identificado según su país y región de procedencia, para su análisis posterior de (poli)fenoles totales.

Tabla 3.1. Material de cacao empleado y procedencia, según el estudio realizado.

ESTUDIO	MATERIAL DE CACAO		PROCEDENCIA
Estadio del grano	Grano fresco		Costa de Marfil (Daloa y Alepe) Guinea Ecuatorial (Norte y Sur) (1) República Dominicana (2)Perú Venezuela (Rio Caribe y Chuao)
	Semilla no fermentada secada al sol		
	Semilla fermentada secada al sol		
	Semilla no fermentada tostada		
	Semilla fermentada tostada		
Origen geográfico	Semilla no fermentada secada		Costa de Marfil Guinea Ecuatorial (1)República Dominicana (2)Perú Venezuela Colombia Ecuador
Fenotipo del grano	Semilla no fermentada secada al sol	"*Alta sangre criolla*"	Venezuela (Rio Caribe)
		"*Mediana sangre criolla*"	
		"*Baja sangre criolla*"	

(1), (2) Lote de semilla no fermentada secada de la República Dominicana y Perú empleado en el estudio del estadio y origen geográfico respectivamente.

Figura 3.1.

Muestras de semillas de cacao fermentadas secadas al sol, no fermentadas secadas al sol y fermentadas tostadas de Guinea del Norte.

3.2.1.2. Estudio del efecto del origen geográfico.

Para este estudio se prepararon semillas no fermentadas secadas de Costa de Marfil (variedad Forastero), Guinea Ecuatorial (variedad Forastero-Amazónica), Venezuela (variedad Trinitario), Ecuador de la región de Quevedo (triple híbrido Amazónico-Trinitario-Canelo Amazónico) y de Colombia de la región de San Vicente (variedad Amazónico) **(Tabla 3.1.)**. Los granos frescos fueron directamente extraídos del fruto o mazorca evitándose la fermentación y fueron directamente secados durante tres días hasta un contenido en humedad aproximado del 5%. En el caso de la República Dominicana y Perú, se tuvo en cuenta el lote de semillas no fermentadas secadas al sol (variedad Criollo) analizadas en el estudio anterior. Cada lote de semilla no fermentada secada, fue clasificado e

identificado según su origen y variedad botánica para su análisis posterior de (poli)fenoles totales.

3.2.1.3. Estudio del efecto del fenotipo de cacao.

Lotes representativos de unos 100 gramos de semillas de cacao no fermentadas secadas al sol de la región Nororiental de Rio Caribe, estado de Sucre, en Venezuela, fueron preparados en origen para este estudio **(Tabla 3.1.)**. Para ello, se cosecharon mazorcas de madurez completa e intermedia o estado pintón, **(Figura 3.2.A)** que procedían de una mezcla de híbridos (Amazónico con distintas influencias de cacao Criollo) de la variedad de cacao Semicriollo, "del tipo con *sangre criolla*"; es decir que procedían de distintos grados de intercruce y tenían distintos porcentajes de sangre criolla **(Figura 3.2.C y 3.2.D).** Las mazorcas se abrieron y los granos con la pulpa adherida se sumergieron en agua fría evitándose una fermentación inicial, secándose a continuación al sol hasta un contenido de humedad aproximado del 7% **(Figura 3.2.B).** Los granos de cacao fueron divididos, clasificándose en tres categorías en función del color púrpura que presentaban. A las semillas que presentaban una pigmentación blanca se las etiquetó como "*alta sangre criolla*" (por su alto porcentaje de cacao Criollo); los que presentaban una pigmentación púrpura fuerte se las etiquetó como "*baja sangre criolla*", ya que presentaban bajas influencias de cacao Criollo (con bajo porcentaje de sangre criolla); y a los que presentaban una coloración rosada o intermedia entre ambas, se las etiquetó como "*mediana sangre criolla*" Las semillas de cacao no fermentadas fueron peladas o descascarilladas obteniéndose por un lado la cáscara y por otro lado el "nib" de cacao. La determinación de (poli)fenoles totales se realizó en las muestras de semilla entera, "nib" y en las muestras de cáscara de cacao.

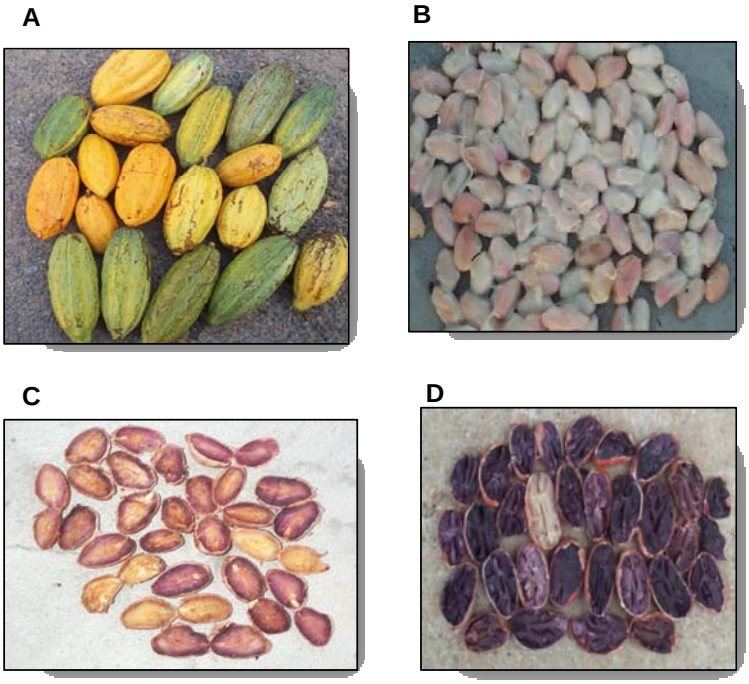


Figura 3.2.

A: Mazorcas de madurez completa y pintón empleadas en el estudio fenotipo del grano. **B:** Mezcla del grano de cacao sumergido en agua y secado al sol obtenida en el estudio fenotipo del grano. **C** y **D:** Granos de cacao con sangre criolla procedentes del estudio fenotipo del grano.

3.2.2. Determinación de la humedad.

Ha sido necesaria la determinación de la humedad en todas las muestras para referir los resultados de (poli)fenoles totales a materia seca.

La humedad en todas las muestras de cacao fue determinada por la pérdida de peso al secarlos en estufa a 100 ºC.

Muestras representativas de 5 g de cacao molidas, se pesaron en balanza analítica de precisión 0,1 mg. A continuación fueron introducidas en

la estufa a 100 ºC hasta pesada constante. Los análisis se realizaron por duplicado.

3.2.3. Cuantificación de (poli)fenoles totales.

El contenido de (poli)fenoles totales fue determinado en las muestras de cacao mediante un ensayo colorimétrico usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología descrita por Singleton *&* Rossi, (1965) con alguna modificación.

3.2.3.1. Preparación de las muestras.

Las muestras de semillas frescas se descongelaron a temperatura ambiente durante 1 día. Todas las muestras de semillas frescas, no fermentadas secadas al sol, fermentadas secadas al sol, no fermentadas tostadas y fermentadas tostadas así como las muestras de “nib” y cáscara de cacao se molieron en un molinillo de laboratorio MS 50 (Taurus).

3.2.3.2. Extracción.

Para la extracción de (poli)fenoles totales, 1 g de cada muestra de cacao molida, fue extraída con 100 mL de mezcla extractiva acetona:agua (70:30; v:v) a reflujo (60 ºC) durante 2 horas. La mezcla fue filtrada en caliente y a vacio empleando un embudo büchner y papel de filtro de 90 mm. La acetona fue eliminada en rotavapor a 45 ºC sin llevar a sequedad. El resto de la disolución se llevó a un matraz aforado de 100 mL con agua destilada asegurando la completa disolución de la muestra en un baño de ultrasonidos. Las extracciones para cada tipo de muestra fueron realizadas por duplicado y en algunos casos por triplicado.

3.2.3.3. Muestras.

Para la reacción de Folin-Ciocalteu, se tomó una alícuota de 5 mL de la solución de muestra en un matraz de 100 mL, se añadieron 20 mL de agua, 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, España) y 40 mL de carbonato sódico anhidro (Scharlab, España) al 10%; preparándose de forma simultánea un blanco con 20 mL de agua destila, 5 mL de reactivo del Fenol y 40 mL de carbonato de sodio anhidro al 10%. Se esperó a que transcurriera la reacción durante 60 minutos en la oscuridad. Se enrasó la disolución con agua y se leyó la absorbancia de la muestra en el equipo a 750 nm ajustando a cero con el blanco. Esta muestra fue preparada por triplicado.

3.2.3.4. Cuantificación.

Para la cuantificación se preparó una solución de 1000 ppm de ácido gálico monohidratado (Scharlab, España) en agua. A partir de la cual se prepararon soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm en agua destilada. En matraces de 100 mL, se añadieron por triplicado 5 mL de cada una de las soluciones de ácido gálico preparadas, 20 mL de agua destilada, 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, España) y 40 mL de carbonato sódico anhidro (Scharlab, España) al 10%, dejando que transcurriera la reacción durante 60 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se enrasaron las disoluciones con agua y se leyeron las absorbancias de las diferentes soluciones a 750 nm ajustando a cero con el blanco. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Agilent 8453 (Agilente Technologies, EE.UU).

3.2.4. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se muestran como media y desviación estándar del número de repeticiones.

Para evaluar la variación del contenido de (poli)fenoles totales en función de la materia prima cacao y el fenotipo del grano, se aplicó un análisis factorial de la varianza (ANOVA) y los valores medios se compararon mediante el test de rango múltiple, test de Duncan. Los niveles de significación estadística se representaron mediante letras, mostrando diferencias significativas ($p<0,05$). Para el análisis estadístico se utilizó el Statgraphics plus software versión 5.1.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Variación del contenido de (poli)fenoles totales según el estadío de la materia prima.

La **Figura 3.3** y **Tabla 3.2**. presentan los resultados del contenido en (poli)fenoles totales, obtenidos de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu, en grano de cacao en diferentes estadios, así como los resultados de humedad de cada semilla. Estos resultados se realizaron con el objetivo de seleccionar la mejor materia prima para elaborar el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles. En total se estudiaron cacaos procedentes de cinco países, de los que durante distintos meses, fueron recibiéndose las diferentes muestras. De algunos países se recibieron muestras de dos regiones como fue el caso de Guinea (región Norte y Sur), Costa de Marfil (región de Daloa y Alepe) y Venezuela (Rio Caribe y Chuao).

El rango de variación de (poli)fenoles en la semilla no fermentada secada al sol se estableció en 4-9,7 g/100 g; en la semilla no fermentada tostada, en 3,1-6,9 g/100 g; en la semilla fermentada secada al sol, en 2,7-6,3 g/100 g; en el grano fresco, en 1-2,8 g/100 g y en la semilla fermentada tostada en 0,75- 2,7 g ácido gálico/100 g **(Tabla 3.2.).** Estos amplios rangos de variación observados dentro de cada estadio de grano, fueron debidos a las diferentes variedades botánicas de cacao de cada país.

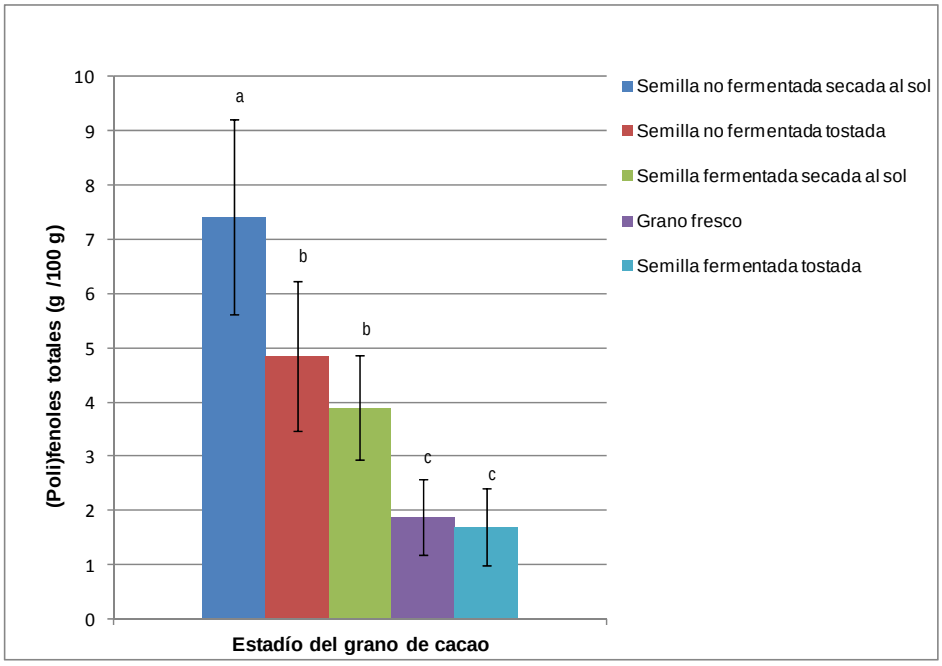


Figura 3.3.

Contenido de (poli)fenoles totales (g/100 g semilla p.s.) medidos como equivalentes de ácido gálico en semillas no fermentadas secadas al sol, semillas no fermentadas tostadas, semillas fermentadas secadas al sol, grano fresco y semillas fermentadas tostadas. Las columnas representan la media de lotes de cinco orígenes geográficos y las barras de error la desviación estándar. Columnas con diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas según el test de rango múltiple de Duncan (p<0.05).

Cuando se analizaron los valores medios de (poli)fenoles para cada estadio de grano **(Figura 3.3.),** los resultados mostraron que el promedio más alto de (poli)fenoles se obtuvo con las semillas no fermentadas secadas al sol, siendo este valor significativamente más alto que en el grano fresco. Este resultado podría explicarse por la degradación de los (poli)fenoles debido a la reacción de pardeamiento enzimático observada durante la descongelación y molienda del grano fresco. Así, de acuerdo a lo descrito por Wollgast & Anklam, (2000) para evitar cualquier tratamiento postcosecha y determinar el contenido de epicatequina en granos frescos de cacao, estos deben de ser inmediatamente liofilizados una vez son sacados de la mazorca, con el fin de impedir estas reacciones de oxidación.

Se observó una disminución significativa en el contenido de (poli)fenoles entre las semillas no fermentadas secadas al sol (7,4 g/100 g) y las fermentadas secadas al sol (3,9 g/100 g) **(Tabla 3.2.).** Lo que confirma que se produce una reducción significativa del contenido de (poli)fenoles en la semilla de cacao después del proceso de fermentación **(Figura 3.3.)**. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por Caligiani *et al*. (2007) que encontraron una correlación negativa entre el contenido de (poli)fenoles con el grado de fermentación, mostrando que el contenido de (poli)fenoles se incrementaba en el orden de la semilla más fermentada (color marrón oscuro), a la semilla parcialmente fermentada (color violeta), a la semilla no fermentada (color pizarra).

Por otro lado, el valor medio de (poli)fenoles totales en la semilla no fermentada tostada fue de 4,8 g/100 g y en la semilla fermentada tostada de 1,7 g/100 g; estos valores mostraron también una reducción significativa del contenido de (poli)fenoles totales después del proceso de tostado de las semillas no fermentadas secadas y de las semillas fermentadas secadas **(Figura 3.3.)**. El proceso de tostado a 150 ºC durante 30 minutos dio lugar a una degradación del 35 % en la semilla no fermentada tostada y del 56 % en la semilla fermentada tostada, siendo la degradación de los mismos debida a las altas temperaturas y elevados tiempos de tostado que hacen que estos

(poli)fenoles se oxiden y polimericen con otras moléculas (Wollgast *&* Anklam, 2000).

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con datos recogidos en la literatura. Así, Kealey *et al*. (1998) mostraron una disminución del 48% en el contenido de (poli)fenoles totales cuando la temperatura de tostado se incrementaba de 127 a 181 ºC en semillas no fermentadas, demostrando que la temperatura es un factor importante en el mantenimiento de los (poli)fenoles de cacao, especialmente de los oligómeros mayores. Delonga *et al*. (2011) observaron un 14% de reducción de (poli)fenoles totales después del proceso de tostado de semillas de cacao a 150 ºC durante 20 minutos. Recientemente, Afoakwa *et al*. (2015) han descrito una disminución en el contenido de (poli)fenoles totales, *o*-difenoles y antocianinas del 57%, 84% y 48%, respectivamente, después del proceso de tostado a 120 ºC durante 45 minutos en semillas fermentadas y secadas, cuyas mazorcas de cacao fueron almacenadas durante 10 días después de su cosecha.

Con respecto a los valores de (poli)fenoles totales obtenidos según el método de Folin-Ciocalteu, nuestros resultados están en concordancia con otros resultados obtenidos para semillas de cacao. Así, Porter *et al*. (1991) publicaron un contenido de (poli)fenoles del 2% en peso para semillas de cacao frescas y no fermentadas. Además, Kowalska *&* Sidorczuk, (2007) encontraron que el contenido de (poli)fenoles totales en semillas de cacao de Costa de Marfil (medido según el método de Folin-Ciocalteu y utilizando el ácido gálico como estándar) era del 2,15- 2,23%; estos valores coinciden con el valor medio obtenido en este trabajo para el grano fresco de cacao **(Tabla 3.2.)**.

Wollgast *&* Anklam, (2000), publicaron alrededor de un 6% de (poli)fenoles totales para semillas de cacao no fermentadas y secadas hasta un 6% de humedad. Este valor está en consonancia con el valor medio obtenido en este trabajo para las semillas de cacao no fermentadas secadas al sol con un 6% de humedad. Estos mismos autores publicaron un 5% de

(poli)fenoles totales para semillas fermentadas, indicando que contenidos iguales o superiores al 10%, son ejemplos de una mala o incompleta fermentación de cacao. Este valor del 5%, es próximo al valor medio obtenido en este trabajo para las semillas de cacao fermentadas secadas al sol **(Tabla 3.2.).**

Tabla 3.2. (Poli)fenoles totales (g/100 g semilla p.s.) obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu en distintos estadios de grano.

		GRANO FRESCO	SEMILLA NO FERMENTADA SECADA AL SOL	SEMILLA FERMENTADA SECADA AL SOL	SEMILLA NO FERMENTADA TOSTADA	SEMILLA FERMENTADA TOSTADA
ORIGEN	**REGION**	**(POLI)FENOLES TOTALES[1]**				
GUINEA	Norte	1,5	9,7	5,0	6,5	1,8
			8,3			
			8,7			
	Sur	2,8	9,3	6,3	6,9	1,5
			9,0			
C.MARFIL	Daloa	2,4	8,7	2,7	5,0	0,89
			8,2	3,5		2,7
			8,1			
	Alepe	1,4	8,2	4,0	5,3	2,7
			7,7	3,2		1,0
R.DOMINICANA	Altagracia	1,0	4,0	3,1	3,1	1,4
PERÚ		1,0	5,0	4,1	3,8	0,75
VENEZUELA	Rio Caribe	2,8	6,0	4,2	4,9	2,7
		2,3	5,9	4,1		2,1
	Chuao	1,9	5,0	3,5	3,4	1,6
				3,7		1,5
Número de muestras		9	15	12	8	12
MEDIA		**1,9 (0,7) [c]**	**7,4 (1,8) [a]**	**3,9 (1,0) [b]**	**4,8 (1,4) [b]**	**1,7 (0,7) [c]**
HUMEDAD[2]		**51,1 (3,3)**	**6,2 (1,2)**	**6,3 (0,5)**	**0,53 (0,07)**	**0,62 (0,07)**

[1]Resultados expresados como equivalentes de ácido gálico en peso seco. [2]Resultados de humedad expresados en g /100 g. Media de lotes procedentes de cinco orígenes geográficos para cada estadio de grano, entre paréntesis la desviación estándar. Columnas con distintas letras muestran diferencia significativa según el test de rango múltiple de Duncan (p<0,05).

3.3.2. Variación del contenido de (poli)fenoles totales según el origen geográfico de la materia prima.

La **Tabla 3.3.** muestra el contenido de (poli)fenoles totales medidos por el método de Folin-Ciocalteu en muestras de grano de cacao no fermentado secado, de orígenes geográficos distintos y pertenecientes a diferentes variedades botánicas.

El clon CCN 51 de Ecuador presentó el mayor contenido medio de (poli)fenoles totales (8,4 g/100 g) aunque con valores similares al de Costa de Marfil y Colombia (8,2 g/100 g y 8,1, respectivamente). El cacao de la República Dominicana, presentó el contenido más bajo de las muestras estudiadas (4 g/100 g).

Este clon es un genotipo identificado producido en la región de Quevedo en el Ecuador. Se trataba de un triple híbrido que procede del cruce del clon amazónico IMC67 con el clon Trinitario ICS95, el cual a su vez fue cruzado con el genotipo Canelo Amazónico, regional de la zona de Quevedo.

Los resultados obtenidos muestran que la cantidad de (poli)fenoles del cacao procedente de la variedad Criollo fue menor que la variedad Forastero y Trinitario así como del cruce de ambas, hecho que estaría relacionado con las variaciones asociadas al lugar de producción y a la variedad de cacao. Así, Kim & Keeney (1984) mostraron que el contenido de epicatequina en semillas de cacao no fermentadas y liofilizadas de diferentes variedades, variaba entre 34,7 y 43,3 mg/g (de muestra desgrasada), mostrando también en ese mismo estudio, que el contenido de epicatequina en semillas podía variar entre 2,66 y 16,5 mg/g (de muestra desgrasada) según el país de producción.

Tabla 3.3. (Poli)fenoles totales (g/100 g semilla p.s.) obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu en semillas de cacao no fermentadas de Costa de Marfil, Guinea Ecuatorial, Venezuela, República Dominicana, Perú, Colombia y Ecuador.

ORIGEN GEOGRAFICO	VARIEDAD DE CACAO	(POLI)FENOLES TOTALES
Costa de Marfil	Forastero	8,2 (1,8) [1]
Guinea Ecuatorial	Amazon Forastero	7,2 (1,0) [2]
Venezuela	Trinitario	6,4 (0,6) [3]
R. Dominicana	Criollo	4,00 [4]
Perú	Criollo	5,00 [4]
Colombia	Amazónico	8,1 (0,4) [1]
Ecuador	Hibrido Amazónico-Trinitario-Canelo Amazónico (Clon CCN51)	8,4 (0,9) [2]

Resultados expresados como equivalentes de ácido gálico en peso seco. [1]Media de dos lotes preparados [2]Media de tres lotes preparados. [3]Media de cuatro lotes preparados.[4]Un lote preparado, entre paréntesis la desviación estándar.

Otros estudios más recientes han descrito que el contenido de (poli)fenoles en semillas de cacao varía dependiendo del origen geográfico (Bordiga *et al*., 2015; Khan et al., 2014; Othman *et al*., 2010). Así, Othman *et al*. (2010) publicaron que el contenido de epicatequina se encontraba en el rango de 2,70 a 12,4 mg/g para granos secos de cacao procedentes de cuatro orígenes diferentes. Khan *et al.* (2014) afirmaron que dependiendo del origen geográfico y la variedad, el contenido total de (poli)fenoles del grano de cacao variaba entre 40 y 84 mg/g. No obstante, cabe resaltar que existen factores externos como son los factores ambientales y agronómicos (las condiciones climáticas como intensidad de la luz y temperatura, el uso de fertilizantes de cacao, y la aparición de heridas) que afectan a la cantidad de los compuestos fenólicos en plantas (Zapata *et al*., 2015).

3.3.3. Variación del contenido de (poli)fenoles totales según el fenotipo del grano de cacao.

La **Tabla 3.4.** muestra el contenido de (poli)fenoles totales obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu en muestras de semilla, "nib" y cáscara de granos no fermentados de la variedad Semicriollo clasificados según el color de la semilla como "*alta*" "*baja*" y "*mediana*" *sangre criolla*.

La especie de cacao procedía de híbridos de cacaos Amazónicos con distintas influencias de cacao Criollo, tipo sangre Criolla. Esta variedad producida en la región Nororiental de Rio Caribe (Venezuela), se estudió con la finalidad de evaluar las diferencias en el contenido de (poli)fenoles entre granos no fermentados que presentaban diferente pigmentación. En un estudio publicado por Rojas *et al*. (2008), observaron diferencias en el contenido de (poli)fenoles totales de dos variedades de cacao colombianas producidas en el mismo campo, cuyos genotipos presentaban un color de semillas diferentes.

La clasificación se estableció en función del color púrpura que presentaban las semillas. El tipo de grano clasificado como "*alta sangre criolla*" pertenecía a la semilla de cacao que presentaba una pigmentación blanca; la "*baja sangre criolla*" pertenecería a la semilla de cacao que presentaba una pigmentación púrpura fuerte; y la "*mediana sangre Criolla*" a la que presentaba una coloración rosada o intermedia entre ambas **(Figura 3.2.D).**

El contenido de (poli)fenoles totales cuantificado fue de 2,2 g/100 g en semillas con pigmentación blanca ("*alta sangre criolla*"); 6,5 g/100 g en semillas con pigmentación rosada ("*mediana sangre criolla*") y 6,6 g/100 g en semillas con pigmentación púrpura ("*baja sangre criolla*"). Dado que el color púrpura de las almendras de cacao está relacionado con las antocianinas, se esperaba encontrar diferencia en cuanto al contenido de (poli)fenoles en los

tres tipos de semilla clasificadas, sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos **(Tabla 3.4)** no se observó diferencia significativa en el contenido de (poli)fenoles entre el fenotipo "*baja* y "*mediana sangre criolla*", encontrándose diferencias significativas entre la "*alta sangre criolla"* con los otros dos fenotipos. Estos resultados serían los esperados ya que el cacao Criollo tiene en general un menor contenido de estos compuestos (Wollgast & Anklam, 2000).

El contenido de (poli)fenoles cuantificado en la cáscara fue significativamente más bajo que el cuantificado en el "nib" y en la semilla entera. Sin embargo, se observó un ligero incremento de (poli)fenoles en el "nib" respecto de la semilla entera, aunque esta diferencia no fue significativa. Este hecho es debido a que la cáscara de cacao posee una menor concentración de (poli)fenoles concentrándose mayoritariamente en el "nib".

Por tanto, los dos fenotipos que presentaron un mayor contenido de (poli)fenoles fueron los que presentaban una pigmentación púrpura fuerte así como rosada, siendo el "nib" la parte de la semilla de cacao donde se obtuvo el mayor contenido de (poli)fenoles.

Estos resultados confirman la gran variabilidad dentro de la población cacaotera venezolana, que hace que dentro de una misma región y para una misma variedad de cacao, se produzcan semillas de cacao con diferentes fenotipos originando un mayor rango de variación en el contenido de (poli)fenoles entre semillas incluso de la misma cosecha.

Tabla 3.4. Valores medios de (poli)fenoles totales (g/100 g p.s.) obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu en semilla entera, “nib” y cáscara del grano no fermentado secado clasificado según el fenotipo: “Baja”, “Alta” y “Mediana” “*sangre criolla*”.

	FENOTIPO CACAO AMAZONICO-CRIOLLO		
MUESTRA	***“Baja sangre criolla”***	***“Mediana sangre criolla”***	***“Alta sangre criolla”***
Semilla	6,6 (1,0) $^{a\,A}$	6,5 (0,5) $^{a\,A}$	2,2 (0,9) $^{b\,A}$
“Nib”	7,5 (0,9) $^{a\,A}$	7,5 (0,5) $^{a\,A}$	1,9 (1,0) $^{b\,A}$
Cáscara	3,2 (0,0) $^{a\,B}$	2,6 (0,0) $^{a\,B}$	1,5 (0,0) $^{b\,B}$

Resultados expresados como equivalentes de ácido gálico en peso seco. Resultados son la media de tres repeticiones, entre paréntesis la desviación estándar. Letras diferentes en minúscula muestran diferencia significativa dentro de una misma fila. Letras diferentes en mayúscula muestran diferencia significativa dentro de una misma columna; según el test de rango múltiple de Duncan (p<0,05).

3.4. CONCLUSIONES

El proceso de fermentación del cacao da lugar a importantes cambios químicos y estructurales del grano, y conduce a una disminución significativa del contenido de (poli)fenoles. Como consecuencia de las altas temperaturas de tostado, se han producido pérdidas de (poli)fenoles tanto en las semillas no fermentadas como en las semillas fermentadas, ya que las altas temperaturas de tostado producen la oxidación y degradación de los mismos.

El país de origen que presentó el mayor contenido de (poli)fenoles en semillas no fermentadas de todas las estudiadas fue Ecuador, en concreto el cacao producido en la región de Quevedo; presentando el genotipo

identificado como el clon CCN51, procedente del cruce de híbridos de cacaos Amazónicos con Trinitario y Canelo- Amazónico, el contenido más alto.

Dentro de la variedad de cacao Semiocriollo producida en la región de Rio Caribe en Venezuela, se encontraron fenotipos de grano que mostraban diferencias en el contenido de (poli)fenoles según el color de la semilla, presentando el fenotipo ”*alta sangre criolla*” un contenido significativamente menor. Este hecho indica, que incluso dentro una misma variedad de cacao, producida en el mismo país y región, se obtiene un grano heterogéneo en cuanto a pigmentación y por tanto en el contenido de (poli)fenoles. De ese mismo estudio, se demostró que la parte de la semilla de cacao que proporcionaba el contenido de (poli)fenoles más elevado era el “nib”.

Es probable que la introducción del material clon CCN51 como materia prima tenga un impacto en la provisión de (poli)fenoles para su posterior aislamiento. Por tanto, el tipo de material de cacao que ha sido seleccionado como materia prima para producir el ingrediente rico en (poli)fenoles, fue el “nib” procedentes de grano de cacao no fermentado del clon CCN51 de la región de Quevedo en Ecuador.

CAPÍTULO 4

Inactivación de la enzima polifenol oxidasa en grano de cacao

4.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El escaldado es un proceso habitual en la industria agroalimentaria para el tratamiento de productos vegetales con el fin de inactivar la enzima polifenol oxidasa (PPO). Esta enzima, presente en las semillas de cacao, es una métalo enzima (0,2% Cu) oxidorreductasa que actúa oxidando los (poli)fenoles durante la reacción de pardeamiento enzimático del grano de cacao. Como consecuencia de la acción de la enzima sobre los (poli)fenoles, se produce la degradación y reducción de las mismas, dando lugar a polímeros melanoides coloreados. La (-)-epicatequin es el principal sustrato de la enzima PPO en las reacciones de pardeamiento enzimático durante la etapa de secado del grano (Kim & Keeney, 1984).

En las semillas frescas de cacao los (poli)fenoles y la enzima PPO se encuentran almacenadas en células diferentes, de modo que cuando las células pierden su permeabilidad selectiva, ambos componentes actúan recíprocamente comenzando la conversión de (poli)fenoles a taninos. Esto puede demostrarse cortando un grano fresco de cacao y observando el pardeamiento enzimático que ocurre de forma inmediata en el borde del grano (Kattenberg & Willemsen, 2003).

A lo largo de la fermentación aeróbica, la enzima PPO cataliza dos reacciones básicas: la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa) y la oxidación de los *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa o catecolasa) (Afoakwa *et al*., 2015). En ambas reacciones la PPO utiliza el oxígeno molecular como co-sustrato. A continuación, tiene lugar la polimerización de la *o*-benzoquinona con otros flavonoides, desarrollándose finalmente los polímeros melanoides. Estos polímeros coloreados (melanoidinas), presentan actividad antibacteriana actuando también como mecanismo de defensa frente a determinados factores medioambientales (Marshall *et al.,* 2000).

La presencia y actividad de esta enzima durante la fermentación y secado de las semillas son los dos factores más importantes para determinar la calidad del sabor del cacao, comenzando en la fase oxidativa de la fermentación y continuando durante el secado (Lima *et al*., 2001). Así, la importancia de esta enzima en la calidad del cacao está relacionada con la reducción del sabor astringente.

Diferentes trabajos de investigación mostraron que el uso de esta enzima reduce el contenido de (poli)fenoles, y por tanto, la astringencia y amargor del cacao contribuyendo a una mejor aceptación del mismo. Lima *et al.* (2001) describieron la reducción significativa de los compuestos (poli)fenólicos de "nibs" de cacao insuficientemente fermentados tratados con la enzima PPO. De Brito *et al.* (2002) publicaron que el empleo de enzima PPO exógena es útil en la reducción del contenido de (poli)fenoles en "nibs" de cacao. Misnawi *et al.* (2003) observaron que durante la incubación de semillas no fermentadas de cacao (en tampón acetato, pH 5,5 a 45 ºC) se producía una disminución del contenido de (-)-epicatequina debido a la oxidación de los (poli)fenoles por la acción de la enzima PPO, describiendo también una disminución significativa del contenido de procianidinas (de monómeros a pentámeros) y del sabor astringente.

La inactivación de la enzima PPO en las semillas de cacao preserva el contenido de (poli)fenoles al reducir los fenómenos de degradación enzimática, permitiendo el aislamiento de la fracción de (poli)fenoles. Así, Kattenberg & Willemsen, (2003) publicaron como método de inactivación de la enzima el calentamiento del grano fresco no fermentado de cacao a 100 ºC, aplicando calor con microondas. Posteriormente, Bradbury *et al.* (2008) describieron un proceso para inactivar la enzima PPO en el grano fresco de cacao mediante calentamiento con agua a 95-98 ºC durante 15-60 minutos en condiciones de presión atmosférica. Sin embargo, anteriormente Kim & Keeney, (1984) mostraron que el calentamiento por microondas de grano de cacao hasta una temperatura interna de 105 ºC durante cinco minutos, previo a su proceso de secado al sol durante dos días, no inactivó de forma eficaz la enzima PPO. Esto provocó una reducción del contenido de (-)-

epicatequina en el grano siendo este contenido de aproximadamente un 50% menor cuando se comparó con el contenido de (-)-epicatequina de granos que habían sido inmediatamente liofilizados después de sacarlos de la mazorca.

Teniendo en cuenta el efecto que tiene la enzima PPO sobre la oxidación de los compuesos (poli)fenólicos, y con el objetivo de preservar el contenido inicial de estos antioxidantes en semillas frescas y no fermentadas de cacao cuando son extraídas de la mazorca y durante el secado de las mismas, se debe evitar la actividad endógena de la enzima PPO.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, el objetivo de esta experiencia fue estudiar las condiciones más adecuadas y el proceso más favorable a nivel industrial para la inactivación de la enzima PPO en granos frescos de cacao, reduciendo las pérdidas de (poli)fenoles durante la manipulación y procesado industrial con la finalidad de preservar el contenido de estos compuestos.

Para la consecución de este objetivo, el trabajo se dividió en las siguientes partes: (i) estudiar las mejores condiciones (tiempo/temperatura) de inactivación de la enzima PPO en grano fresco de cacao, mediante tratamiento de calor con agua o escaldado y evaluando el grado de melanosis; (ii) comparar el contenido de (poli)fenoles totales y flavanoles en semillas de cacao con la enzima PPO inactivada frente a semillas de cacao no fermentadas; (iii) estudiar el proceso de inactivación de la enzima PPO a escala piloto.

4.2. MATERIAL Y METODOS

4.2.1. Inactivación de la enzima PPO en grano de cacao.

4.2.1.1. Estudio de las condiciones de inactivación de la enzima PPO en grano de cacao y evaluación del grado de melanosis.

La inactivación de la enzima PPO en semillas frescas de cacao fue realizada aplicando un tratamiento térmico con agua o un procedimiento de escaldado**.** Para el estudio de las condiciones de su inactivación, se midieron los parámetros tiempo y temperatura, tomándose como superficie de respuesta la reacción de pardeamiento enzimático mediante la evaluación del color con un análisis colorimétrico visual.

Para el diseño experimental de esta experiencia, se tuvieron en cuenta diferentes temperaturas de escaldado (75, 85, y 95 ºC) y diferentes tiempos de tratamiento (5, 10, y 15 minutos), resultando un total de 9 ensayos. Para evaluar la actividad de la enzima y acelerar la reacción de pardeamiento enzimático durante el análisis de color, se empleó como reactivo catecol al 1% que actuaría como sustrato de la enzima PPO poniendo en evidencia la mayor o menor actividad de la enzima. De este modo se definieron las condiciones de tiempo y tratamiento térmico óptimo para inhibir el pardeamiento enzimático en el grano de cacao. Para cada tratamiento fueron preparadas muestras control sin tratamiento térmico. Para interpretar visualmente el grado de melanosis o reacción de pardeamiento enzimático alcanzado en el grano de cacao se usó una escala de color **(Tabla 4.1.)** (Marshall *et al*., 2000).

Inmediatamente antes de la realización de cada ensayo, las mazorcas de cacao fueron descongeladas a temperatura ambiente. El grano fresco de cacao fue extraído manualmente de la mazorca, separándo la pulpa y manteniendo sumergido el grano recién extraído en agua, para evitar el

inicio de la reacción de pardeamiento enzimático y consecuente oxidación, antes de aplicar el correspondiente tratamiento de calor **(Figura 4.1.)**.

Para cada tratamiento de calor aplicado, se pesaron 80 gramos de grano fresco y se sumergieron en un baño con 2 litros de agua a temperatura controlada (previamente calentada hasta la temperatura prefijada). Se esperó a que la temperatura interna de la semilla alcanzara la temperatura del baño controlando la misma con un termopar y comenzando a contar el tiempo, a partir de alcanzar la temperatura interna prefijada. Una vez completado el tiempo del tratamiento térmico, las semillas fueron sumergidas rápidamente en agua fría. Tras concluir el tratamiento, se colocaron las semillas de cacao tratadas y las no tratadas en un vidrio de reloj, utilizando las semillas no tratadas como blanco o control.

A todas las semillas se les realizó un pequeño corte con un cuchillo en la superficie e inmediatamente se añadieron con una pipeta Pasteur unas gotas de catecol al 1%. A continuación se observó el grado de pardeamiento o melanosis de las semillas, anotando los resultados en función de la escala hedónica previamente establecida **(Tabla 4.1)** (Marshall *et al*., 2000).

Figura 4. 1.

Grano fresco recién extraído de la mazorca y sumergido en agua**.**

Tabla 4. 1. Escala hedónica puntuada de color utilizada para describir la progresión de melanosis en los granos frescos de cacao (Marshall *et al.,* 2000).

ESCALA DE MELANOSIS	DESCRIPCIÓN
0	Nada pardeado
2	Ligeramente pardeado. Perceptible en alguna semilla de cacao
4	Ligeramente pardeado. Perceptible en la mayoría de las semillas de cacao
6	Moderadamente pardeado. Perceptible en la mayor parte de las semillas de cacao
8	Fuertemente pardeado. Perceptible en la mayor parte de las semillas de cacao.
10	Fuertemente pardeado. Totalmente inaceptable.

4.2.2. Preparación del grano de cacao con la enzima PPO inactivada. Evaluación de los compuestos (poli)fenólicos en el grano.

4.2.2.1. Tratamiento de escaldado del grano.

Para realizar la cuantificación de los compuestos (poli)fenólicos en el grano de cacao con la enzima PPO inactivada, se descongelaron tres mazorcas de cacao de la misma variedad y origen evitándose una excesiva manipulación de las mismas, de modo que se impidieran daños por golpes. Inmediatamente, antes de la realización del escaldado, se abrieron las mazorcas de cacao y se desgranaron, separándose la pulpa de las semillas

frescas, evitando una excesiva manipulación de las semillas. A continuación, se sumergieron unos 300 gramos de semillas frescas en un baño de agua de 7 litros, previamente calentada hasta ebullición y a temperatura controlada; asegurando que todos los granos quedaban bien sumergidos en el agua. Se midió la temperatura interna de las semillas con un termopar, introduciendo la sonda en el interior de una de las semillas que se encontraba en el centro del baño. Una vez la temperatura interna de la semilla alcanzó los 95 ºC, se mantuvieron en el baño de agua durante 5 minutos. Transcurridos los mismos, se sacaron las semillas del agua y se enfriaron con un chorro de agua fría. Seguidamente se escurrieron y se extendieron sobre papel secante, presionando ligeramente para secar las semillas lo máximo posible. A continuación, se secaron las semillas en una estufa de aire forzado a 40 ºC durante 3 días reduciendo el contenido de humedad hasta aproximadamente un 5%.

De forma paralela, se preparó un grupo de semillas control, tomando tres mazorcas del mismo origen y pesando unos 300 gramos de grano fresco no fermentado que fue secado directamente en la estufa a 40 ºC durante 3 días **(Figura 4.2.)**.

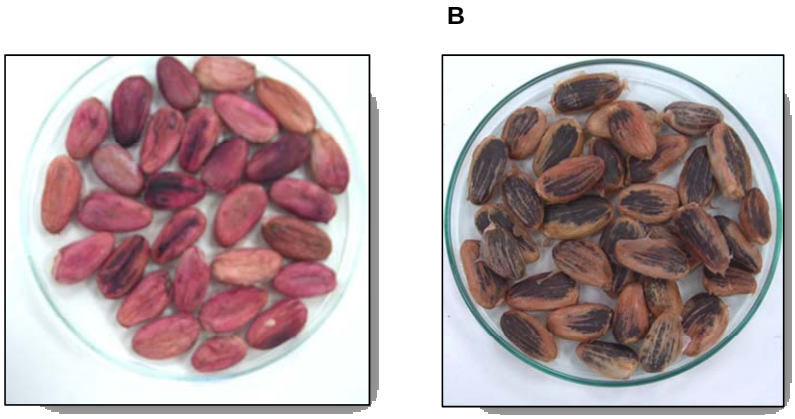


Figura 4. 2.

A: Semillas de cacao inactivadas a 95 ºC durante 5 minutos, y secadas en estufa a 40 ºC. **B:** Semillas de cacao no fermentadas secadas en estufa a 40 ºC (semillas control).

4.2.2.2. Preparación de las muestras de cacao.

Para la preparación de las muestras de cacao para su posterior análisis de (poli)fenoles totales y flavanoles, se descascarillaron manualmente las semillas secas con la enzima PPO inactivada y las semillas no fermentadas secadas (o semillas control). Los "nibs" obtenidos se molieron en un molinillo modelo MS 50 (Taurus). El polvo obtenido se tamizó empleando un tamiz de luz de malla de 0,6 mm. Sobre cada una de las muestras obtenidas, se realizó un análisis de (poli)fenoles totales y flavanoles para la evaluación del proceso de escaldado.

4.2.2.2.1. Análisis de (poli)fenoles totales.

Para el análisis de (poli)fenoles totales, se empleó el método de Folin-Ciocalteu descrito en el **Capítulo 3**. Para la cuantificación, se empleó como estándar ácido gálico monohidratado (Scharlab, Barcelona, España).

4.2.2.2.2. Análisis de flavanoles en fase reversa por cromatografía líquida acoplado a un detector de ultravioleta visible (HPLC-DAD).

Para el análisis de flavanoles en "nibs", se cuantificaron los monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina así como los dímeros de procianidina B1 y procianidina B2 por HPLC-DAD.

<u>Extracción de flavanoles</u>

La extracción y separación cromatográfica de flavanoles en fase reversa en las muestras de cacao y su cuantificación con detector diodo array (DAD), se realizó siguiendo el método de Andrés-Lacueva *et al*. (2000) con alguna modificación.

Se pesaron 0,5 gramos de muestra de cacao. Se añadieron 5 ml de agua destilada hirviendo y se agitó en vortex durante 1 minuto. A continuación se adicionaron 20 ml de metanol acidificado al 0,1% HCl (p/v) agitándose en vortex durante 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 1600 *g* durante 15 minutos a 4 ºC. Se repitió el proceso de extracción volviendo a extraer el residuo sólido con 20 ml de metanol acidificado. Se combinaron los sobrenadantes obtenidos en cada una de las etapas de extracción en un mismo matraz y se eliminó el metanol en un rotavapor a vacío a 35 ºC. El extracto concentrado se enrasó a 50 ml con agua destilada y tras la dilución adecuada, se filtró el extracto con un filtro de PTFE de 0,45 µm inyectándose en el equipo cromatográfico para su análisis en fase reversa.

Cuantificación por HPLC-DAD

Para la separación cromatográfica y cuantificación de los monómeros de (+)-catequina, (-)-epicatequina y dímeros de procianidinas B2 y B1, se inyectaron 20 µl del extracto en un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Agilent 1100 equipado con un desgasificador, bomba cuaternaria, inyector automático y compartimento de columna termostatizado.

Se empleó una columna C18 de fase reversa Zorbax Eclipse XDB (Agilent Technologies, España) de dimensiones 150 mm x 2,1 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm y termostatizada a 35 ºC. La detección se llevó a cabo empleando un detector UV-visible–DAD a una longitud de onda de 280 nm. La fase móvil empleada fue una mezcla de agua acidificada con ácido fórmico al 0,1% (p/v) (A) y acetonitrilo (B) a un flujo establecido constante de 0,6 ml/min. El gradiente fue el siguiente: 0-25 min, 4-10% fase B lineal; 25-30 min, 10-13% fase B lineal; 30-33 min, 13-15% fase B lineal; 33-35 min, 15-50% fase B lineal; 35-40 min, 50-4% B lineal, 40-45 min, se establecieron las condiciones iniciales.

Para la identificación y cuantificación de los flavananoles se emplearon patrones comerciales de (±)-catequina hidrato (Sigma, España), (-)-epicatequina (Sigma, España), procianidina B2 (Extrasynthese, España) y procianidina B1 (Extrasynthese, España). La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención con los de los patrones.

Preparación de la recta de calibrado.

La recta de calibrado se obtuvo preparando concentraciones para catequina de 5, 10, 15, 20 y 25 ppm; para epicatequina de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm; para la procianidina B2 de 5, 10, 20, 40 y 50 ppm; y para la procianidina B1 de 1, 3, 5, y 10 ppm.

4.2.2.3. Determinación de la humedad.

Ha sido necesaria la determinación de la humedad en todas las muestras para referir los resultados de (poli)fenoles totales y flavanoles a materia seca. La humedad en las diferentes muestras fue determinada por desecación hasta peso constante según se describe en el **Capítulo 3**.

4.2.2.4. Análisis estadístico.

El estudio de evolución de la melanosis en función del tiempo y la temperatura, fue sometido a un análisis de la varianza (ANOVA). Se representaron los gráficos de respuesta de la ecuación del modelo ajustado. Para determinar diferencias en el contenido de (poli)fenoles totales y flavanoles entre las muestras de semilla con la PPO inactivada se aplicó un análisis de comparación de medias mediante “t de Student”, estableciendo diferencias para $p<0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el Statgraphics plus software versión 5.1.

4.2.3. Acondicionamiento e infraestructura para el escalado piloto del proceso de escaldado de grano fresco de cacao en el país de origen. Descripción de diferentes modelos.

Se diseñaron y probaron diferentes modelos "*in situ*", en el país de origen, para evaluar el manejo del grano fresco en campo durante la realización del proceso de escaldado a 95 ºC durante 5 minutos. Los modelos de escaldado que fueron diseñados y empleados fueron identificados con las siguientes nomenclaturas: (i) ensayo con "mallas", (ii) ensayo en "jaula"y (iii) ensayo "libre y agitando".

Se ha elegido como método más adecuado para estudiar la inactivación de la enzima PPO en grano de cacao, el tratamiento de calor con agua o escaldado, por la facilidad que ofrece este método para escalar el proceso a nivel industrial. Para la realización de los ensayos, se utilizaron mazorcas de cacao recolectadas y desgranadas justo la mañana anterior al ensayo **(Figura 4.3. A)**. Las semillas de cacao frescas recién obtenidas, fueron trasladadas hasta la zona del procesado en unos recipientes con agua fría, donde permanecieron hasta el momento de realizar los ensayos **(Figura 4.3. C)** Durante el tiempo previo al procesado, se controló la temperatura de forma que se evitase el comienzo de la fermentación y tratando de retardar el comienzo de la reacción de pardeamiento enzimático. En todos los casos, al introducir las semillas en el baño de agua caliente, como consecuencia de la transferencia de calor se produjo una disminución de la temperatura del baño de 10 ºC; se esperó a que la temperatura interna de las semillas de cacao subiera hasta la temperatura del baño prefijada, comenzándose a contabilizar el tiempo a partir de la temperatura interna alcanzada en el interior del grano. Posteriormente, los procesos de desecación del grano fueron los mismos para todos los ensayos, distribuyendo los granos escaldados sobre una superficie lisa en el patio y desecándolos por acción del sol, hasta alcanzar una humedad inferior al 7%.

Figura 4. 3.

A: Desgranado de las mazorcas de cacao. **B:** Semillas frescas desgranadas. **C:** Contenedor con semillas frescas sumergidas en agua. **D:** Transporte de las semillas de cacao frescas a la zona del procesado.

Los tres ensayos de escaldado que se llevaron a cabo en origen tras la recogida de las semillas frescas, se describen a continuación.

(i) Modelo ensayo "con malla".

En este ensayo se emplearon mallas en las que eran introducidos los granos frescos de cacao. Posteriormente, las mallas eran sumergidas en un reactor con agua, previamente calentado hasta ebullición **(Figura 4.4. A)**.

Con el termopar, se midió la temperatura interna de las semillas insertando la sonda del termopar en el interior de la misma. Una vez alcanzada la temperatura de 95 ºC se mantuvieron las semillas durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se sacaron del baño rápidamente y se lavaron pasándolas por un chorro de agua fría **(Figura 4.4. B)**.

A B

Figura 4. 4.

A: Mallas empleadas en el ensayo para sumergir el grano fresco de cacao.

B: Enfriamiento del grano fresco de cacao en agua.

(ii) Modelo ensayo "en jaula".

En este modelo se empleó una jaula para sumergir el grano fresco de cacao en el interior del reactor **(Figura 4.5.)**. No se cargó la jaula totalmente con grano de cacao, sino que se dejó un espacio suficiente para que al introducir el grano en el agua, éste pudiera flotar así como desplazarse para lograr una correcta transferencia de calor entre todos los granos. Tras introducir la sonda del termopar en el centro de la masa de grano de cacao, y una vez que se alcanzó la temperatura adecuada, se realizó el proceso de escaldado del grano a 95 ºC durante 5 minutos. A continuación, se enfriaron

los granos haciéndoles pasar un chorro de agua fría. Se extendieron las semillas en patio para su secado.

Figura 4. 5.

Jaula empleada para sumergir el grano fresco de cacao

(iii) Modelo ensayo "libre y agitando".

Este ensayo consistió en introducir el grano fresco de cacao directamente en una olla con agua hirviendo **(Figura 4.6. A)**. Después de introducir el grano, se agitó la masa de cacao de forma manual durante todo el tiempo que duró el ensayo de escaldado, manteniendo el grano en constante movimiento. De este modo, se consiguió un mayor movimiento de los granos de cacao y una mayor rapidez en la penetración de calor hacia el interior de las semillas. La temperatura también fue controlada manteniendo las mismas condiciones de temperatura y tiempo que en los ensayos anteriores. Posteriormente, para escurrir el grano y enfriarlo, se empleó un colador **(Figura 4.6. B)**, y se enfriaron los granos haciéndoles pasar un chorro de agua fría. A continuación, las semillas fueron extendidas en patio para su secado al sol.

Figura 4. 6.

A: Recipiente empleado para calentar el grano con agitación manual y sonda ubicada en el centro de la olla. **B:** Colador empleado para sacar el grano de cacao y enfriarlo antes de extenderlo en patio. **C:** Secado en patio del grano de cacao.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Condiciones de inactivación de la enzima PPO en grano fresco.

El objetivo de este ensayo fue la determinación de las condiciones de inactivación (relación tiempo-temperatura) de la enzima PPO mediante tratamiento de calor con agua en el grano fresco de cacao. Como respuesta, se tomó la reacción de pardeamiento enzimático evaluada mediante escala hedónica puntuada del grado de melanosis percibido **(Tabla 4.1.)**.

La **Tabla 4.2.** muestra los resultados obtenidos para el grado de melanosis después del ensayo de escaldado con agua realizado a las temperaturas de 75, 85 y 95 ºC durante los tiempos de 5, 10 y 15 minutos, respectivamente. La **Figura 4.7.** incluye las imágenes con un ejemplo del color que presentaron las semillas de cacao después del tratamiento de calor con agua a 75 ºC durante 5 minutos.

Tabla 4. 2. Grado de melanosis observado (según Tabla 4.1.) generado por la adición de catecol al 1% en semillas frescas tratadas a 75, 85 y 95 ºC durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente.

ENSAYO DE ESCALDADO CON AGUA DEL GRANO FRESCO CACAO			
Tiempo	**5 min**	**10 min**	**15 min**
Temperatura	Melanosis	Melanosis	Melanosis
75 ºC	6	6	8
85 ºC	4	2	4
95 ºC	0	2	4

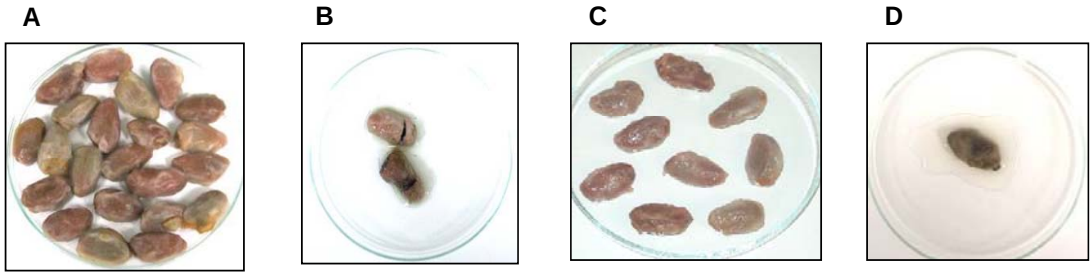


Figura 4. 7.

A: Semillas de cacao tratadas a 75 ºC durante 5 minutos. **B**: Semillas tratadas a 75 ºC durante 5 minutos con catecol al 1%. **C:** Testigo no sometidos a tratamiento. **D:** Testigo con catecol al 1%.

De acuerdo a los resultados presentados en la **Tabla 4.2.** se observó que el tiempo y la temperatura óptima necesaria para producir la inactivación de la enzima polifenol oxidasa en grano fresco de cacao, fue de 95 ºC durante 5 minutos, observándose durante este tratamiento térmico, la

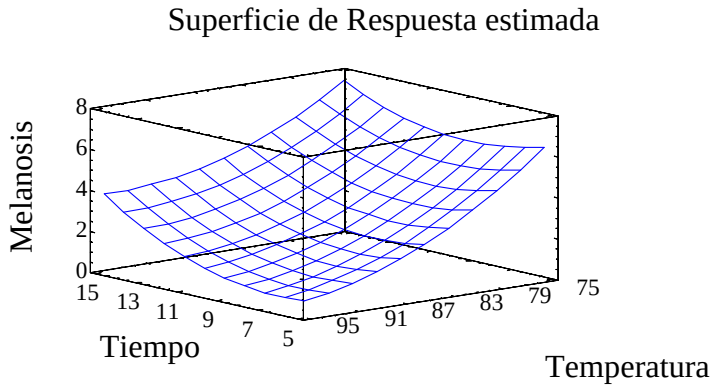
ausencia total de melanosis o pardeamiento enzimático de las semillas de cacao.

Sin embargo, se observó que a los 15 minutos de tratamiento, para las tres temperaturas ensayadas, se producía un aumento del grado de melanosis u oscurecimiento del grano, debido posiblemente a reacciones de pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard.

Para evaluar el efecto de las condiciones de tratamiento sobre la actividad de la enzima se aplicó un ANOVA de dos factores considerando el efecto del tiempo y la temperatura de forma independiente, así como la interacción entre ambos factores. De los resultados de este estudio se observó que la temperatura tiene un efecto significativo en la reducción de la enzima PPO (p=0,017), pero no las condiciones de tiempo aplicadas durante el ensayo al igual que tampoco se observó un efecto significativo en la interacción de ambos factores.

El gráfico de respuesta de superficie **(Figura 4.8.)** muestra igualmente el efecto significativo de la temperatura (p< 0.05) sobre la variabilidad del grado melanosis, en comparación con el efecto del tiempo que no fue. Así, se puede observar cómo el aumento de la temperatura se corresponde con un descenso significativo (p<0,05) del grado de melanosis en todos los tiempos, ya que los resultados mostraron un descenso de 6 a 0; 6 a 2 y 8 a 4 del grado de melanosis al incrementar la temperatura de 75 a 95 º C a los tratamientos de 5, 10 y 15 minutos, respectivamente. Este efecto descendiente del grado melanosis asociado al aumento de la temperatura, nos indica la inactivación de la enzima PPO en los granos de cacao frescos.

Vista 1



Vista 2

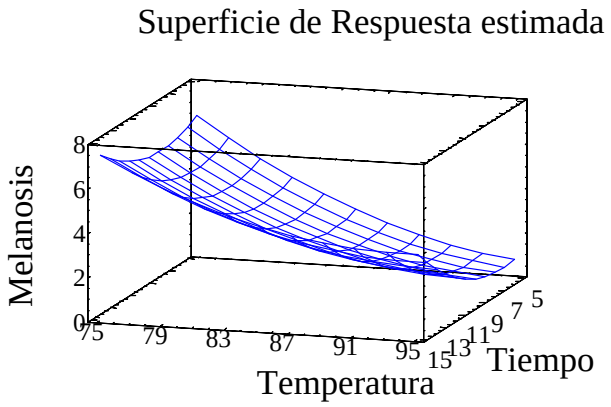


Figura 4.8

Efecto de la temperatura y el tiempo con el grado de melanosis en grano de cacao. Representación 3D superficie de respuesta estimada. Vista 1 y 2.

Ecuación del modelo ajustado:

Melanosis= 105,25-1,45*tº -2,03333*Tª+0,04* tº ^{2}+0,01* tº Tª+0,01 Tª ^{2}

Donde la **Figura 4.8** es la representación gráfica de respuesta de la ecuación del modelo ajustado.

4.3.2. Análisis de (poli)fenoles totales y flavanoles en semillas de cacao con la enzima PPO inactivada secadas y semillas no fermentadas secadas.

Para la evaluación del proceso de inactivación de la enzima PPO en grano de cacao, se cuantificaron los (poli)fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en las semillas de cacao con la enzima PPO inactivada según el método de escaldado descrito anteriormente (95 ºC/5 min.) y en las semillas control (no fermentadas). También, se cuantificaron los flavan-3-oles (+)-catequina, (-)-epicatequina y sus dimeros, la procianidina B1 y procianidina B2, al ser los compuestos mayoritarios en el cacao (Lamuela *et al*., 2005).

Para la cuantificación de los monómeros (-)-epicatequina, (+)-catequina y los dímeros de procianidina B2 (epicatequina-epicatequina) y procianidina B1 (epicatequina-catequina), se empleó un HPLC-DAD. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.9** y **Tabla 4.3.** y las **Figuras 4.10.** y **4.11.** muestran los respectivos cromatogramas obtenidos en cada tipo de semilla por HPLC-DAD en fase reversa.

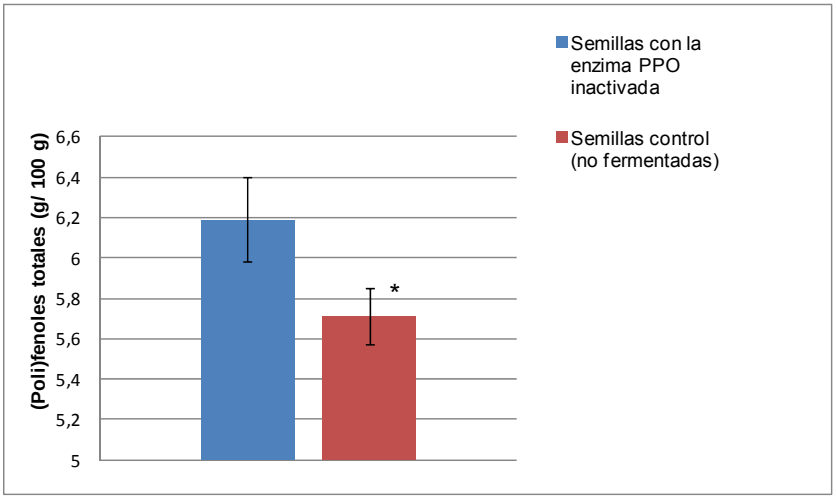


Figura 4.9.

Contenido de (poli)fenoles totales por Folin-Ciocalteu en “nibs” de semillas con la enzima PPO inactivada y “nibs” de semillas control (no fermentadas). Columnas son la media de tres repeticiones (n=3) y las barras de error, la desviación estándar. Resultados expresados como equivalentes de ácido gálico en peso seco.*Diferencias significativas para $p<0,05$

Tabla 4. 3. Valores medios de flavanoles (mg/g "nib" p.s.) obtenidos en "nibs" de semillas de cacao con la enzima PPO inactivada y "nibs" de semillas no fermentadas.

	FLAVANOLES				
Muestra	**(-)-Epicatequina**	**(+)-Catequina**	**Procianidina B1**	**Procianidina B2**	**Suma Flavanoles**
Semillas con la enzima PPO inactivada	9,6 (1,5)	0,42 (0,06)	N.D.	6,4 (1,0)	**16,4 (2,6)**
Semillas no fermentadas (control)	7,4 (0,1)*	0,25 (0,01)*	N.D.	4,4 (0,1)*	**12,1 (0,2)***

*Diferencia significativa para *p*<0,05. Resultados son la media de dos repeticiones, entre paréntesis la desviación estándar. N.D. No Detectado

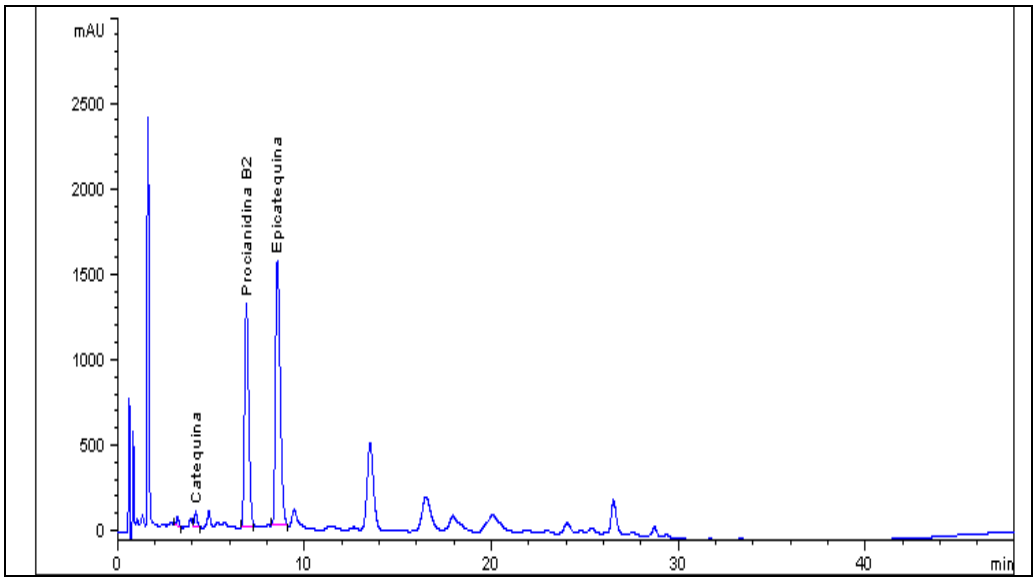


Figura 4. 10.

Cromatograma obtenido por HPLC-DAD (ʎ= 280 nm) en semillas de cacao con la enzima PPO inactivada a 95 ºC 5 minutos.

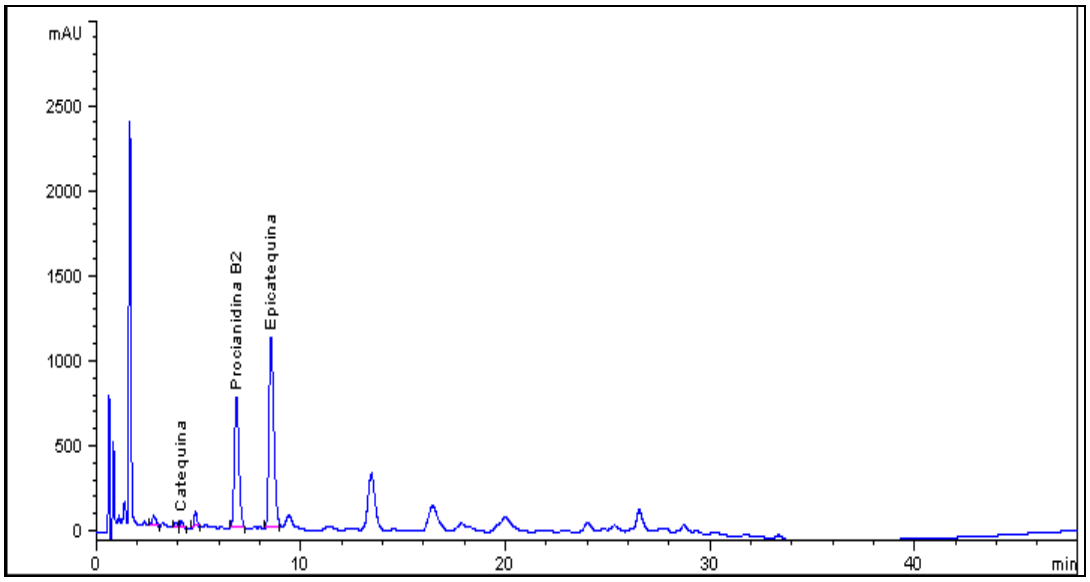


Figura 4. 11

Cromatograma obtenido por HPLC-DAD (ʎ= 280 nm) en semillas de cacao no fermentadas (semillas control).

El método de análisis cromatográfico ha permitido la separación y cuantificación de la (+)-catequina, (-)-epicatequina y procianidina B2 en un tiempo de 10 minutos, no detectándose la procianidina B1. El compuesto mayoritario cuantificado en “nib” de grano de cacao fue la (-)- epicatequina, seguido de la procianidina B2 con valores medios de 9,6 y 6,4 mg/g respectivamente, en el caso de las semillas con la enzima PPO inactivada; y de 7,4 y 4,4 mg/g respectivamente, para las semillas no fermentadas o semillas control. Siendo el contenido de (-)-epicatequina y procianidina B2 cuantificado en las semillas con la enzima PPO inactivada, un 30 y un 44% más alto respectivamente, que el cuantificado en las semillas control (no fermentadas). En todos los casos se observaron diferencias significativas para los compuestos analizados en función del escaldado o inactivación de la PPO.

Dado que las catequinas son los compuestos mayoritarios en las semillas de cacao, la mayoría de artículos publicados sobre análisis de (poli)fenoles en cacao y derivados, se han centrado en estos compuestos.

Así, Lamuela *et al*. (2005) publicaron valores de (-)-epicatequina, (+)-catequina, procianidina B2 y B1, de 3,28; 0,72; 0,92 y 0,16 mg/g respectivamente, en "nibs" de cacao. Más recientemente, Bordiga *et al.* (2015) encontraron valores de (-)-epicatequina de 1,20-3,91 mg/g; (+)-catequina de 0,27-0,79 mg/g; procianidina B2 de 0,57-1,67 mg/g y procianidina B1 de 0,02-0,05 mg/g en "nibs" de cacao previo al proceso de tostado.

Pudiendo deberse las diferencias entre los valores publicados para la epicatequina y procianidina B2, con los valores encontrados en este trabajo para las semillas no fermentadas, al hecho de que los valores recogidos en la lieratura científica corresponden a granos de cacao fermentado. Así, valores de epicatequina publicados en semillas de cacao sin fermentar de diferentes variedades, están entre 34,65 y 43,27 mg/g (por muestra desgrasada) (Kim *&* Keeney, 1984). Si la semilla tiene un 54% de grasa y un 6% de agua (Wollgast *&* Anklam, 2000), esta cantidad equivaldría a 15 y 19 mg/g (por peso de semilla), valores más próximos al valor de epicatequina encontrado en nuestro estudio.

También, Payne *et al*. (2010) publicaron valores de (-)epicatequina de 16 mg/g en semillas que habían sido liofilizadas y de 12,4 mg/g en semillas no fermentadas secadas al sol, siendo el contenido de (-)-epicatequina en las semillas liofilizadas un 29% más alto que el de las semillas no fermentadas secadas al sol.

El valor de (poli)fenoles totales cuantificado por el método de Folin-Ciocalteu en ambos tipos de semillas, mostró diferencia significativa entre las semillas con la enzima PPO inactivada y las semillas control (no fermentadas) **(Figura 4.9.)**. Además de las diferencias en el contenido de (poli)fenoles totales y de flavanoles se ha observado una notable diferencia de color entre las semillas con la enzima PPO inactivada y las semillas control (no fermentadas) **(Figura 4.2.)** lo que demuestra una protección de los compuestos fenólicos tras la inactivación de la enzima, evitando así la degradación. La pigmentación rosada que muestran las semillas no

fermentadas con la PPO inactivada, indica la presencia de antocianinas que proporcionan esta coloración. Por el contrario, la pigmentación marrón oscuro que presentaron las semillas no tratadas, es atribuida a la presencia de productos de oxidación enzimática de (poli)fenoles en presencia de oxigeno durante el secado del grano. En concreto, debido a reacciones de complejación de taninos condensados (flavonoides polimerizados de elevado peso molecular) con proteínas, vía puentes de hidrógeno (Misnawi *et al.,* 2003).

En resumen, los resultados obtenidos en esta experiencia ponen de manifiesto una pigmentación rosa intensa en las semillas escaldadas, así como un incremento del contenido de (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B2, al inactivar la enzima PPO tras aplicar un tratamiento de 95 ºC durante 5 minutos, previo a su proceso de secado.

4.3.3. Escalado piloto del proceso de escaldado del grano fresco de cacao.

Se examinaron diferentes formas de realizar el proceso de escaldado del grano fresco de cacao, con la intención de evaluar el manejo de mayores volúmenes de grano fresco así como los resultados del proceso de escaldado. Para evaluar la eficacia de los distintos métodos en la inactivación de la PPO se realizó una inspección visual evaluando la coloración y el grado de melanosis.

(i) Ensayo con malla:

Durante el tratamiento de escaldado del grano fresco de cacao empleando la malla, se ha observado como inconveniente la dificultad para que el grano se moviera dentro de la misma, lo cual determina un

aumento del tiempo necesario para que en el interior de la semilla se alcanzasen los 95 ºC, seleccionados para el tratamiento. Por ello, los resultados mostraron un elevado porcentaje de granos con coloración marrón externa **(Figura 4.12. A)**. La prueba de corte realizada, mostró también coloración marrón en la parte interna del grano **(Figura 4.12. B)**; siendo atribuida esta coloración oscura no deseable, a reacciones de pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard, debido probablemente a un sobrecalentamiento.

Figura 4. 12.

A: Parte interna del grano de cacao escaldado en el ensayo con malla. **B:** Aspecto externo del grano de cacao escaldado en el ensayo con malla.

(ii) Ensayo en jaula:

En el ensayo de escaldado en jaula, a pesar de que el grano tenía más espacio para el movimiento, no se consiguió homogeneidad en la aplicación de calor durante el tratamiento. Al igual que en el ensayo con malla, se observó un aumento del tiempo necesario para que la temperatura interna de la semilla alcanzase los 95 ºC. Con el ensayo de escaldado en

jaula, se obtuvo también un elevado porcentaje de granos que presentaban una coloración marrón externa no deseable en el grano.

(iii) Ensayo “libre y agitando”:

Durante la realización del escaldado en el ensayo libre, y agitando la masa de cacao, el grano tuvo un mayor espacio para conseguir una transferencia de calor homogénea. Con ayuda del agitador, se consiguió un mayor movimiento del grano, y por tanto, mayor rapidez en la penetración del calor hacia el interior de la semilla. En este ensayo, al mantener la masa de cacao en constante movimiento, se consiguió una homogeneidad en la distribución del calor en todos los granos. Este hecho se observó claramente evaluando la coloración de los granos de cacao escaldados, al mostrar mayoritariamente un color violeta, tanto en la parte externa como en el interior de las semillas **(Figura 4.13. A y 4.13. B)**, poniendo de manifiesto la reducción de la oxidación de (catequinas, epicatequinas, procianidinas y antocianinas) y la polimerización enzimática causada por la actividad endógena de la enzima PPO en el grano fresco de cacao (Kattenberg & Willemsen, 2003).

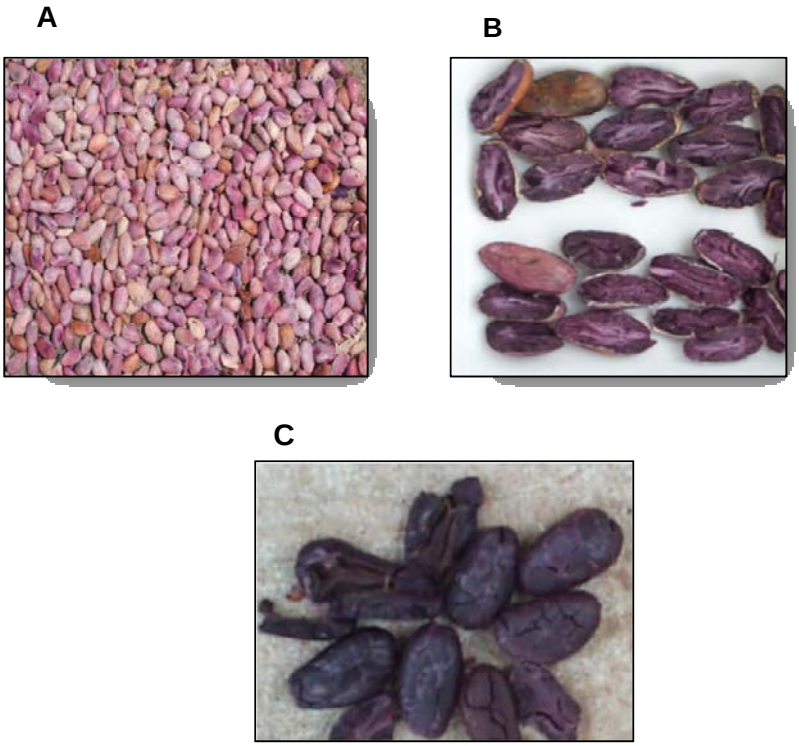


Figura 4. 13.

A: Aspecto externo del grano después del proceso de escaldado en ensayo libre y agitando. **B:** Parte interna del grano después del proceso de escaldado en el ensayo libre y agitando. **C:** “Nibs” de cacao obtenidos.

A partir de los resultados obtenidos del ensayo “libre y agitando”, se diseñó un modelo a muy pequeña escala (modelo en “cilindro”) para lograr movimiento del grano durante el tratamiento de escaldado y para preparar el futuro montaje de escaldado de grano de cacao. Este modelo diseñado, consistió en el empleo de una estructura cilíndrica hecha con una lámina metálica para sumergir el grano. En el centro de la estructura se colocó el agitador para facilitar el movimiento de las semillas durante el calentamiento **(Figura 4.14. A)**. Ese recipiente metálico fue posteriormente introducido en un recipiente con agua hirviendo **(Figura 4.14. B)**, introduciendo el grano de cacao con el agua hirviendo y una vez finalizado el tiempo de tratamiento, escurriendo el grano para proceder al secado del mismo en el patio **(Figura 4.14. C).**

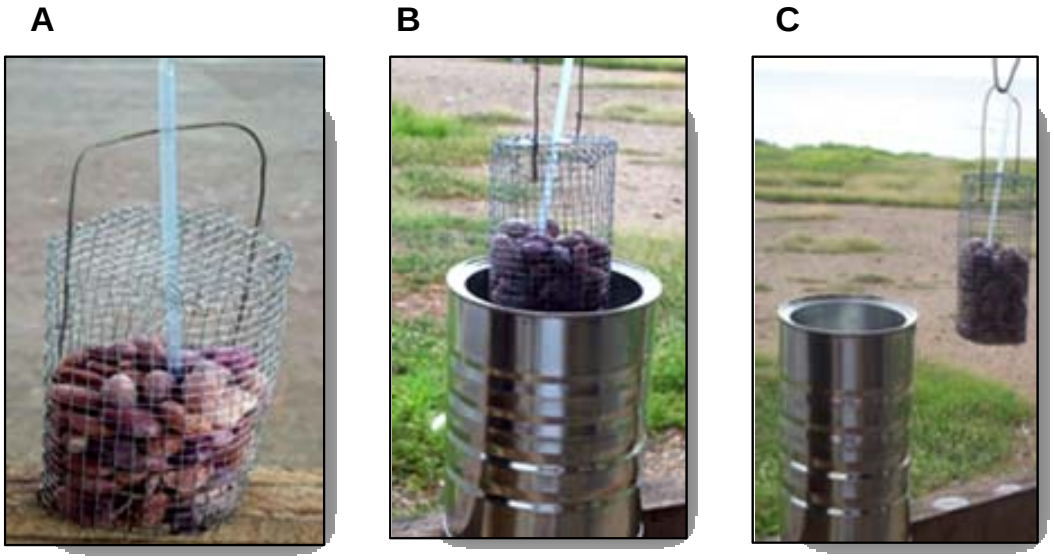


Figura 4.14.

A: Estructura cilíndrica con agitador hipotético empleada para sumergir el grano**.**

B: Recipiente cilíndrico con agua hirviendo para realizar el ensayo de escaldado.

C: Enfriamiento y desplazamiento del grano antes de proceder al secado en patio.

4.4 CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para inactivar la enzima PPO en el grano fresco de cacao, es un tratamiento térmico de escaldado con agua a 95 ºC durante 5 minutos. Este tratamiento térmico de los granos no fermentados previo a su etapa de secado, reducen las pérdidas de los contenidos de (poli)fenoles totales, (-)-epicatequina,(+)-catequina y procianidina B2, en comparación con los granos no fermentados secos.

El ensayo de escaldado del grano fresco de cacao empleando el modelo de ensayo “libre y con agitación de la masa de cacao”, reduce el deterioro enzimático postcosecha, reduciendo el contenido en (poli)fenoles y considerándose un ensayo factible para su aplicación a escala industrial.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que el empleo de “nibs” de cacao, procedentes de semillas no fermentadas con la enzima PPO inactivada mediante el tratamiento de escaldado, puede ser utilizado como materia prima para obtener un ingrediente de cacao con un mayor contenido en compuestos (poli)fenólicos y en concreto en flavanoles.

CAPÍTULO 5

Obtención de prototipos de cacao desgrasado en polvo rico en (poli)fenoles

5.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Como ya se ha mencionado en el **Capítulo 1**, la manteca de cacao es la grasa de las semillas de cacao y representa entre el 50 y 57% en peso seco del grano. La extracción de compuestos fenólicos en matrices con elevado contenido graso, requieren un desgrasado previo por Soxhlet (Escribano *&* Santos-Buelga, 2003). En el caso de las semillas de cacao, ha sido descrita la obtención de extractos de (poli)fenoles a escala de laboratorio, siendo éstos generalmente preparados reduciendo las semillas de cacao a polvo, desgrasando el polvo y extrayendo y purificando los compuestos. Donde el polvo desgrasado es preparado, habitualmente, liofilizando las semillas de cacao, descascarillando las semillas secas liofilizadas y moliendo los "nibs" de cacao obtenidos (Kim *&* Keeney, 1984).

En la bibliografía científica distintos autores han aplicado métodos diferentes de desgrasar con el objetivo de conseguir cacao libre de grasa y poder extraer posteriormente los compuestos (poli)fenólicos. Timbie *&* Keeney, (1977) describieron la preparación de un extracto crudo de cacao; donde el extracto fue preparado a partir de semillas de cacao que habían sido liofilizadas, descascarilladas y molidas a un polvo fino en presencia de hielo seco para evitar la fusión de la manteca y desgrasadas con éter de petróleo. Por otro lado, Cros *et al.* (1982) para estudiar los compuestos fenólicos en cacao, prepararon un cacao en polvo desgrasado a partir de semillas de cacao con diferentes grados de fermentación, secadas al sol y también en estufa. Las semillas habían sido descascarilladas de forma manual, molidas en presencia de hielo seco, tamizadas a un tamaño de partícula ≤ 0,5 mm, y desgrasadas con éter de petróleo durante 24 horas y extracción con Soxhlet. También, Kim *&* Keeney, (1984) estudiaron el contenido de epicatequina en ocho clones de cacao a partir de semillas de cacao no afectadas por variables postcosecha. Para ello, prepararon un cacao en polvo desgrasado a partir de semillas de cacao no fermentadas,

que habían sido liofilizadas según fueron extraídas de la mazorca, descascarilladas, molidas y desgrasadas con hexano durante 16-18 horas.

Kattenberg & Willemsen, (2003) probaron a escala de laboratorio tres procesos para obtener a partir de semillas frescas de cacao con la enzima PPO inactivada, sólidos de cacao secos y desgrasados. Prepararon sólidos de cacao desgrasados por *expeller* y extracción con hexano, a partir de semillas frescas de cacao con la enzima PPO inactivada mediante un rápido calentamiento con microondas a 100 ºC. Así, evaluaron el contenido de (-)-epicatequina como una medida del rendimiento de (poli)fenoles a partir del grano.

Por todo ello, el objetivo de esta etapa experimental ha sido estudiar distintos procesos para la obtención de un prototipo de cacao desgrasado en polvo rico en (polifenoles). Para la consecución de este objetivo, se realizaron los siguientes ensayos:

(i) diseñar a escala de laboratorio diferentes prototipos de cacao en polvo desgrasado para la cuantificación de los (poli)fenoles totales, a partir de granos frescos de cacao no afectados por tratamientos postcosecha; como semillas frescas liofilizadas, semillas no fermentadas secadas al sol y en estufa, y semillas no fermentadas con la enzima PPO inactivada.

(ii) preparar a escala piloto un cacao en polvo desgrasado con CO_2 supercrítico a partir de grano de cacao con la enzima PPO inactivada, y su caracterización analítica mediante la determinación del contenido de catequina, epicatequina, procianidina B1 y B2 y capacidad antioxidante, y compararla con un polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado).

5.2. MATERIAL Y METODOS

5.2.1. Preparación de prototipos de cacao en polvo desgrasado a escala laboratorio.

5.2.1.1. A partir de semillas de cacao liofilizadas.

La preparación del cacao desgrasado, evitándose cualquier tratamiento postcosecha, se realizó a partir de siete mazorcas frescas de Ecuador, de la región de Quevedo, pertenecientes al clon CCN51 **(Figura 5.1. A).** Se prepararon el prototipo A y B de acuerdo a los protocolos de Timbie *&* Keeney, (1977) y Kim *&* Keeney, (1984), respectivamente **(Tabla 5.1.)**.

Las mazorcas frescas de cacao de Ecuador fueron abiertas y las semillas frescas fueron manualmente extraídas eliminándose la pulpa **(Figura 5.1. B).** De cada mazorca se obtuvieron entre 40-60 semillas de aproximadamente 200 gramos de peso que fueron extendidas sobre unas bandejas y congeladas a -84 ºC durante tres días. Posteriormente (unos 600 g de semillas) fueron liofilizadas durante 48 horas **(Figura 5.1. C)**.

Parte de las semillas de cacao liofilizadas fueron descascarilladas manualmente. Los “nibs” obtenidos, fueron molidos en un molinillo de laboratorio con hielo seco para prevenir la posible fusión de la manteca hasta obtener un polvo muy fino. Para la eliminación de la manteca de cacao, el cacao molido fue desgrasado mediante la extracción de la grasa con un equipo Soxhlet, empleando dietiléter a 55 ºC durante 16 horas, para la obtención del prototipo A (Timbie *&* Keeney, 1977) y hexano a 35 ºC durante 19 horas para la obtención del prototipo B (Kim *&* Keeney, 1984). Cada prototipo obtenido, que representaba a sólidos de cacao no afectados por tratamientos postcosecha, fue secado en estufa de vacío a 40 ºC para la eliminación de los solventes residuales. El dietiléter y el hexano fueron

eliminados de la manteca extraída mediante la evaporación en un rotavapor, cuantificando la manteca de cacao extraída en cada extracción.

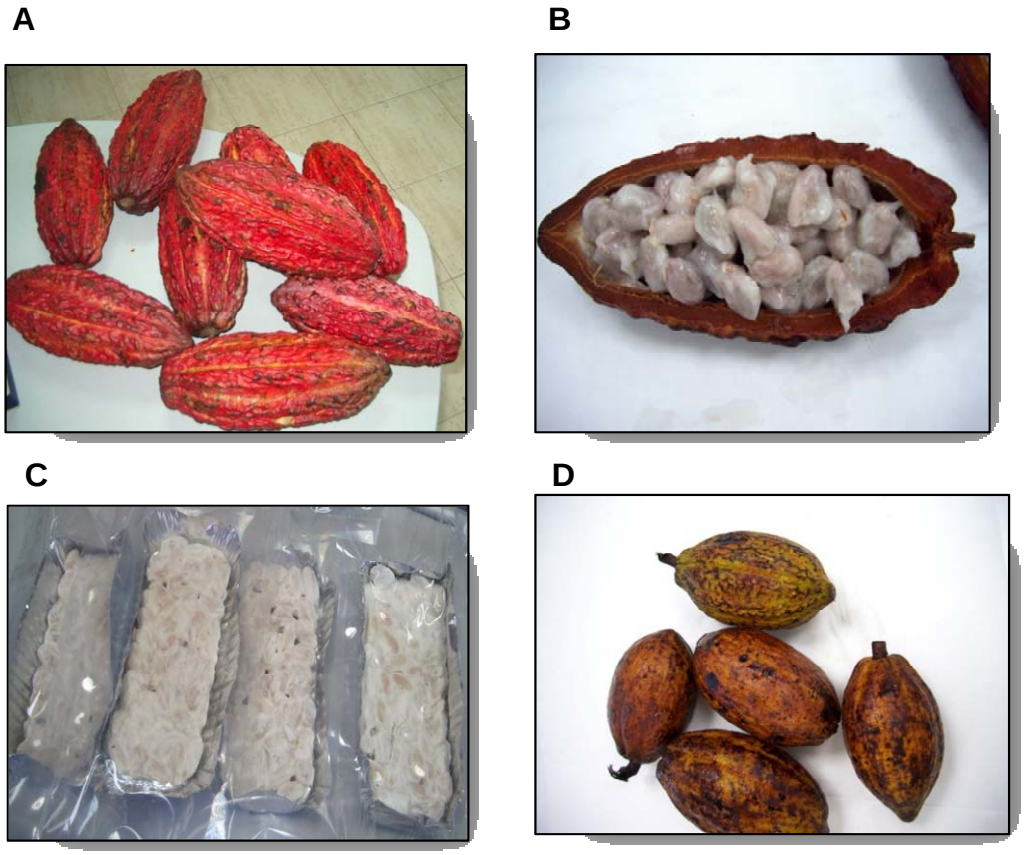


Figura 5. 1.

A: Mazorcas clon CCN51 de Ecuador (región de Quevedo) empleadas en el ensayo; **B:** Semillas frescas (clon CCN51) sin pulpa recién extraídas de la mazorca; **C:** Semillas de cacao clon CCN51 liofilizadas; **D:** Mazorcas de cacao de Costa de Marfil de la variedad Forastero empleadas en el ensayo.

En cada prototipo de cacao en polvo desgrasado preparado (prototipo A y B), se realizó una cuantificación del contenido de (poli)fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu **(Capítulo 3)**, así como de la manteca de cacao residual que permanecía en el polvo desgrasado (método Soxhlet).

5.2.1.2. A partir de semillas de cacao secadas al sol y en estufa.

La preparación de los polvos de cacao desgrasado, a partir de grano no fermentado secado, se realizó con cinco mazorcas de cacao de Costa de Marfil, zona de San Pedro, de la variedad Forastero **(Figura 5.1.D)**. Se prepararon los prototipos C y D de acuerdo al protocolo de Cros *et al*. (1982) **(Tabla 5.1.)**.

Las cinco mazorcas fueron descongeladas, abiertas y las semillas frescas, fueron extraídas manualmente eliminándose la pulpa. De cada mazorca de cacao, se obtuvieron entre 37-46 semillas, con un peso aproximado de 71-126 gramos de semilla fresca. Una parte de las semillas de cacao frescas, fueron secadas en estufa de aire forzado entre 30-35 ºC durante 2 días hasta un contenido de humedad final del 5-6%. La otra parte de las semillas de cacao, fueron secadas al sol durante 2 días y en estufa de aire forzado a 35 ºC durante 17 horas, hasta un contenido de humedad final de las semillas del 5%. Tras el secado y antes de la extracción de la manteca de cacao, todas las semillas de cacao fueron tratadas como se describe en el apartado **5.2.1.1**. El desgrasado se realizó mediante extracción con un equipo de Soxhlet con éter de petróleo a 55 ºC durante 24 horas (Cros *et al*., 1982). Cada muestra de polvo desgrasado obtenido (prototipos C y D), se tamizó empleando un tamiz de luz de malla de 500 micras, obteniéndose en cada caso un polvo fino de tamaño de partícula <0,5 mm, que fue secado en estufa de vacío a 40 ºC para la eliminación de los solventes residuales. El dietiléter fue eliminado de la manteca de cacao extraída en rotavapor para la posterior cuantificación de la manteca de cacao. De cada prototipo obtenido, se realizó una cuantificación del contenido de (poli)fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu **(Capítulo 3)** y de la manteca de cacao residual que permanecía en el polvo desgrasado (método Soxhlet).

5.2.1.3. A partir de semillas de cacao con la enzima PPO inactivada.

La preparación del polvo de cacao desgrasado, prototipo E **(Tabla 5.1.)** a partir de grano fresco no fermentado con la enzima PPO inactivada, se realizó con mazorcas de cacao de Venezuela, de la variedad híbridos de cacao amazónico con criollo, del tipo mediana sangre criolla.

Una vez abiertas las mazorcas de cacao, las semillas fueron manualmente extraídas separándose la pulpa de las semillas. El grano fresco de cacao obtenido, fue tratado de acuerdo al procedimiento de escaldado descrito en el **Capítulo 4** para la obtención de grano no fermentado de cacao con la enzima PPO inactivada. Las semillas de cacao secadas, fueron tratadas como se describe en el apartado **5.2.1.1.** El desgrasado de los "nibs" se realizó con un equipo Soxhlet, empleando diétiléter a 55 ºC y un tiempo de 13 horas de extracción. Las muestras desgrasadas obtenidas, fueron secadas en estufa de vacio a 40 ºC para la eliminación del solvente residual. El diétileter fue eliminado de la manteca extraída en rotavapor para la posterior cuantificación de la manteca de cacao. La manteca de cacao residual que permanecía en cada muestra desgrasada fue cuantificada (método Soxhlet).

Las muestras de cacao en polvo desgrasado obtenidas de cada montaje (prototipo E), se mezclaron y homogeneizaron **(Figura 5.3.)** para la cuantificación del contenido de (poli)fenoles totales por el métodod de Folin-Ciocalteu **(Capítulo 3)**.

Tabla 5. 1. Nomenclatura y clasificación de los prototipos desarrollados a escala de laboratorio en función del tipo de semilla y proceso de desgrasado según protocolo.

PROTOTIPO	A	B	C	D	E
Tipo de semilla	Liofilizadas	Liofilizadas	Secadas al sol y en estufa	Secadas en estufa	PPO inactivada
Origen	Ecuador	Ecuador	Costa Marfil	Costa Marfil	Venezuela
Desgrasado	Dietileter 55 ºC/16 h	Hexano 35 ºC/19 h	Éter de petroleo 55 ºC/24 h	Éter de petroleo 55 ºC/24 h	Dietileter 55 ºC/13 h
Protocolo	Timbie & Keeney, (1977)	Kim & Keeney, (1984)	Cros *et al*. (1982)	Cros *et al*. (1982)	

5.2.2. Preparación de cacao en polvo desgrasado a escala piloto.

El esquema que se ha seguido para la preparación del cacao en polvo desgrasado con CO_2 supercrítico se representa en la **Figura 5.2.**

El ensayo se realizó a partir de mazorcas frescas de cacao de Venezuela, de la variedad mediana sangre criolla, y cuyos granos frescos de cacao habían sido tratados en el país de origen a 95 ºC durante 5 minutos para la inactivación de la enzima PPO. Los granos de cacao fueron secados al sol hasta un contenido en humedad aproximado del 5%. Los granos secos de cacao fueron descascarillados en una descascarilladora industrial. Para realizar la molienda de los “nibs” de cacao, se preparó una molienda en condiciones criogénicas para evitar el aumento de la temperatura por la fricción durante la molienda y por tanto, la formación de una pasta debido a la fusión de la manteca. Unos 40 kilos de fragmentos de “nibs” de cacao, fueron molidos a escala piloto en un molino de martillos al que se le acopló una bala de N_2 líquido. De esta forma, se consiguió que el cacao permaneciera como un polvo fino molido durante la molienda. La distribución del tamaño de partícula del polvo conseguido fue de 0,4-1,5 mm.

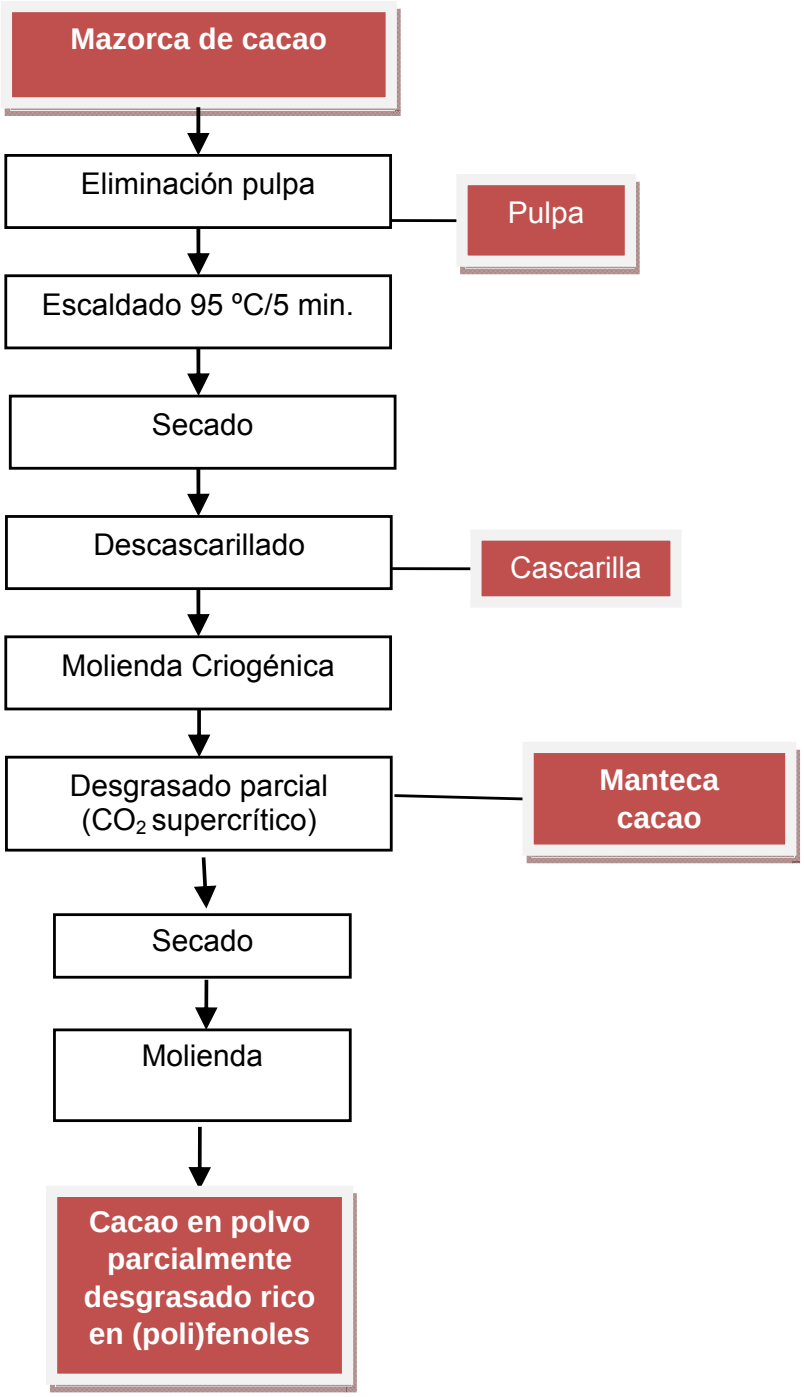


Figura 5. 2.

Esquema de la obtención de cacao en polvo parcialmente desgrasado rico en (poli)fenoles con CO_2 supercrítico a escala piloto.

El ensayo de desgrasado con CO_2 en condiciones supercríticas se realizó externamente (NATECO2 GmbH & Co.KG, Munich, Alemania) a escala piloto con una muestra de 20 kilos de polvo de "nibs" de cacao. Sobre la muestra de "nibs" molidos y del polvo desgrasado obtenido se cuantificó el contenido de (poli)fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu **(Capítulo 3)**, el contenido de flavanoles por HPLC-DAD en fase reversa **(Capítulo 4)**, la capacidad antioxidante por el método de ORAC, el contenido graso de la manteca de cacao del "nib" y la manteca residual que permanecía en el polvo desgrasado (método Soxhlet), y la humedad **(Capítulo 3)**.

5.2.3. Polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado).

El polvo de cacao convencional comercial con el que se compararon los valores de (poli)fenoles del prototipo obtenido a escala piloto, fue un polvo de cacao natural no alcalinizado, color castaño claro, con un contenido graso del 11%, pH 5,6, contenido en humedad del 5% y un tamaño de partícula de un 99% inferior a las 75 micras como constaba en las especificaciones del producto. El polvo de cacao convencional, representaba a un polvo desgrasado obtenido a partir de semillas de cacao fermentadas y secadas en el país de origen, descascarilladas, tostadas, desgrasadas por prensado hidráulico hasta un contenido en grasa del 10-12% y molienda final hasta obtener un tamaño de partícula del 99% inferior a las 75 micras. Sobre la muestra comercial, se determinó el contenido de (poli)fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu **(Capítulo 3)**, de flavanoles por HPLC-DAD en fase reversa **(Capítulo 4)**, de la capacidad antioxidante por el método de ORAC y la humedad **(Capítulo 3)**.

5.2.4. Determinación de (poli)fenoles totales.

Los (poli)fenoles totales en los prototipos desarrollados (A, B, C, D y E), en las muestras de "nibs" molidas, en el cacao en polvo desgrasado con CO_2 supercrítico, y en el polvo de cacao convencional comercial, fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu descrito en el **Capítulo 3**. Para la cuantificación se empleó ácido gálico monohidratado (Scharlab, Barcelona, España).

5.2.5. Capacidad antioxidante (método ORAC).

La medida de la capacidad antioxidante del cacao en polvo desgrasado con CO_2 supercrítico, así como el del polvo de cacao convencional, se realizó por el método ORAC (Cao *et al.,* 1993). El valor de ORAC fue expresado como micromoles equivalentes de trolox por gramo de muestra. Esta medida fue realizada en un laboratorio externo (Brunswick, USA).

5.2.6. Análisis de flavanoles por HPLC-DAD.

Para el análisis de flavanoles en muestras de cacao en polvo parcialmente desgrasado con CO_2 supercrítico y polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado), se cuantificaron los monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina así como los dímeros de procianidina B1 y procianidina B2 por HPLC-DAD de acuerdo a la metodología descrita en el **Capítulo 4**.

5.2.7. Determinación de la humedad.

Ha sido necesaria la determinación de la humedad de las muestras para referir los resultados de (poli)fenoles totales y flavanoles a materia seca. La humedad fue determinada por desecación en estufa de aire caliente hasta alcanzar peso constante según se describe en el **Capítulo 3**.

5.2.8. Determinación del contenido graso por el método Soxhlet.

Muestras representativas de "nibs" de cacao molidas, cacao en polvo desgrasado (prototipos A, B, C, D y E), y cacao en polvo desgrasado con CO_2 supercrítico, fueron pesadas y colocadas dentro de un cartucho de celulosa colocándolo a continuación en el equipo de extracción. Seguidamente se añadió el disolvente no polar (dietileter o éter de petróleo) procediendo a la extracción en continuo de la grasa, hasta completar el procedimiento. El contenido de grasa total se expresó en g/100 g.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Preparación de prototipos a escala de laboratorio.

Se han desarrollado a escala de laboratorio cinco prototipos de cacao en polvo desgrasado (A, B, C, D y E) **(Tabla 5.1.)**, preparados a partir de mazorcas de cacao tratadas según diferentes protocolos (Timbie *&* Keeney, 1977; Kim *&* Keeney, 1984; Cros *et al*., 1982), así como a partir de semillas

no fermentadas y con la enzima PPO inactivada, respectivamente, siguiendo el procedimiento descrito en el **Capítulo 4**.

La **Tabla 5.2.** muestra los resultados del contenido en (poli)fenoles totales obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu en los cinco prototipos obtenidos (muestras de cacao en polvo desgrasadas), la manteca de cacao extraída en cada proceso de desgrasado y la cantidad de manteca residual remanente en el polvo de cacao después de cada extracción.

Tabla 5. 2. Valores medios de (poli)fenoles totales (g/100 g p.s.) obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu en prototipos de cacao en polvo desgrasado, manteca de cacao extraída (g/100 g p.s.) y manteca de cacao residual (g/100 g p.s.).

PROTOTIPO	(Poli)fenoles Totales[(a)]	Grasa extraída	Grasa residual
A	15,7 (0,1)	49,2	0,21
B	12,9 (0,3)	35,2	20
C	4,9 (0,5)	44,9	0,31
D	4,8 (0,2)	44,5	0,53
E	14,6 (0,2)	49,2	1,2

[(a)]Resultados expresados como equivalentes de ácido gálico en peso seco. Resultados son la media de tres repeticiones (n=3) y entre paréntesis la desviación estándar.

El prototipo de cacao con el que se ha observado el mayor contenido de (poli)fenoles totales, de 15,7 g/100 g, ha sido el prototipo A (el cacao obtenido a partir de semillas liofilizadas de Ecuador y desgrasadas empleando dietiléter durante 16 horas) siguiendo el protocolo de Timbie *&* Keeney, (1977). Sin embargo, los prototipos C y D obtenidos de acuerdo al protocolo de Cros *et al.* (1982), han sido los prototipos con una menor cantidad de (poli)fenoles totales, de 5 g/100 g, obtenidos a partir de semillas frescas secadas al sol y estufa, o secadas únicamente en la estufa. Este

hecho podría ser debido a la degradación de los (poli)fenoles por la acción de la enzima PPO durante el secado de las semillas.

El contenido de (poli)fenoles totales obtenido en los prototipos A y B según los protocolos de Timbie *&* Keeney, (1997) y Kim *&* Keeney, (1984) a partir de semillas liofilizadas, fue 3 y 2,5 veces superior respectivamente, al valor obtenido según el protocolo de Cros *et al.* (1982) a partir de semillas secadas al sol y en estufa. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Payne *et al*. (2010) en los que mostraron que el nivel de epicatequina en semillas liofilizadas de mazorcas de cacao era un 29% más alto que las semillas secadas al sol y en estufa.

Los resultados obtenidos para el cacao en polvo desgrasado a partir de semillas con la enzima PPO inactivada (prototipo E), mostraron la obtención de un prototipo de cacao con un contenido residual de grasa entorno al 1% y con un contenido de (poli)fenoles totales de 14,6 g/100 g **(Tabla 5.2.).** La eliminación del 49% de la manteca de cacao contenida en el "nib", ha concentrado el contenido de (poli)fenoles del sólido de cacao desgrasado respecto a su materia prima ("nibs" molidos de cacao), cuyo contenido medio de (poli)fenoles totales fue de 7,3 g/100 g, al no haberse extraído con la fracción lipídica. Se ha obtenido a partir de "nibs" no fermentados de cacao con la enzima PPO inactivada, un cacao en polvo desgrasado de color violeta fuerte en el que se puede apreciar la diferencia de color al compararlo con la de un polvo de cacao convencional, de color marrón, que ha sido obtenido a partir de semillas fermentadas, secadas y tostadas **(Figura 5.3.)**.

Los valores de (poli)fenoles totales obtenidos en el prototipo E fueron próximos a los valores encontrados en el prototipo A, cacao desgrasado a partir de semillas liofilizadas; lo cual indicó que la inactivación de la enzima PPO en el grano fresco de cacao, fue un proceso con el que se ha evitado la degradación de los (poli)fenoles durante el secado del grano. Así, el cacao en polvo desgrasado a partir de semillas con la enzima PPO inactivada, representaba también a un cacao en polvo no afectado por variables

postcosecha en el que se ha conservado la concentración de (poli)fenoles respecto a su materia prima.

Figura 5. 3.

A: Prototipo E preparado a partir de grano con la PPO inactivada **B:** polvo de cacao convencional (cacao natural no alcalinizado).

El porcentaje de grasa extraída por Soxhlet de acuerdo al protocolo de Timbie & Keeney, (1977), Cros *et al.* (1982) y Kim & Keeney, (1984) en los prototipos desarrollados A, B, C y D (**Tabla 5.1.**) ha sido del 49,2%, 35,2%, 44,9% y 44,5%, respectivamente. Obteniéndose con los tres protocolos, cuatro muestras de cacao en polvo desgrasado (prototipos A, B, C y D), que presentaron unos porcentajes de grasa residual del 0,21%, 20%, 0,31% y 0,53%, respectivamente; y humedades finales de 5,7%, 2,3%, 6,8% y 6,6% respectivamente. De acuerdo a los datos presentados en la **Tabla**

5.2., la extracción de la manteca de cacao empleando dietiléter durante 16 horas y 55º C ha sido una extracción más efectiva que el empleo de hexano a 35 ºC durante 19 horas. Debido a la baja temperatura a la que se trabajó con el hexano, el número de recirculaciones del solvente durante la extracción de Soxhlet fue menor (solamente de dos ciclos) respecto a la extracción con dietiléter a 55 ºC que fue mucho más rápida. Este hecho podría explicar que la extracción con hexano a 35 ºC durante 19 horas no fue suficiente para eliminar toda la manteca de cacao de los "nibs", quedando un porcentaje residual elevado del 20%.

5.3.2. Preparación de un cacao en polvo desgrasado con CO_2 en condiciones supercríticas a escala piloto.

Se llevó a cabo la preparación a escala piloto de un prototipo de cacao desgrasado a partir de grano no fermentado con la enzima PPO inactivada. Para realizar la caracterización analítica se cuantificaron los (poli)fenoles totales, los monómeros (+)-catequina, (-)-epicatequina y los dímeros de procianidina B1 y procianidina B2 así como su capacidad antioxidante. Se compararon tales valores con los cuantificados en un polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado).

La **Tabla 5.3.** representa los resultados de (poli)fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, del contenido graso y de la humedad analizado en "nibs" de cacao molidos en condiciones criogénicas, en cacao en polvo desgrasado con CO_2 y en polvo de cacao convencional.

Tabla 5.3. Valores medios de (poli)fenoles totales (g/100 g muestra p.s.), contenido graso en la manteca de cacao (g/100 g muestra p.s.) y humedad (g/100 g) en muestra de "nibs", cacao desgrasado con CO_2 y polvo de cacao convencional.

MUESTRA	(Poli)fenoles totales[(a)]	Contenido graso	Humedad
"Nibs" de cacao molido con N_2 liquido	6,0 (0,1)	47,2 (0,4)	7,8 (0,4)
Cacao en polvo desgrasado con CO_2 supercrítico	10,6 (0,2)	7,3 (0,5)	4,7 (0,2)
Polvo de cacao convencional	5,3 (0,0)	11,0 (0,6)	5,0 (0,5)

[(a)]Resultados expresados como equivalentes de ácido gálico en peso seco. Resultados de (poli)fenoles totales son la media de tres repeticiones (n=3) y entre paréntesis la desviación estándar. Resultados de manteca de cacao y humedad, son la media de dos repeticiones (n=2) y entre paréntesis la desviación estándar.

Es bien conocida la capacidad del CO_2 supercrítico para extraer aceites y grasas de matrices sólidas. En concreto, en cacao ha sido descrita su utilización para extraer la manteca de cacao en "nibs" (Li & Hartland, 1992). Este compuesto posee una temperatura crítica baja (31 ºC) por lo que los compuestos orgánicos que sean termolábiles pueden procesarse sin peligro de desnaturalización. Además, es inerte, no tóxico, accesible y barato, y en condiciones ambientales, el CO_2 es gas, de tal forma que no deja ningún residuo en el producto final. Es por todo ello, por lo que se ha considerado como un procedimiento posible a estudiar para la obtención de un prototipo piloto de cacao desgrasado.

El desgrasado de cacao con CO_2 en condiciones supercríticas ofreció una alternativa al empleo de solventes orgánicos al no dejar trazas residuales en el polvo de cacao obtenido. No obstante, la granulometría del

producto fue decisiva para conseguir buenas condiciones de extracción con esta tecnología, por ello ha sido necesaria la molienda criogénica previa de los fragmentos de "nibs" de cacao. Del resultado del ensayo de desgrasado con CO_2 en condiciones supercríticas, se ha obtenido un cacao en polvo parcialmente desgrasado hasta un contenido graso del 7% **(Tabla 5.3.)**.

Los valores de (poli)fenoles totales cuantificados en el cacao desgrasado coincidieron con los valores esperados después de la eliminación de un 40% de la manteca de cacao (10 g/100 g equivalentes de ácido gálico). Lo que indica que el proceso de extracción de la manteca de cacao con CO_2 supercrítico, no ha producido pérdida de (poli)fenoles totales durante el proceso. Los (poli)fenoles del cacao son hidrosolubles con lo que no se han extraído con la fracción grasa.

La **Tabla 5.4.** representa los valores medios de (-)-epicatequina, (+)-catequina, procianidina B1 y B2 analizados por HPLC-DAD en fase reversa y los valores de la capacidad antioxidante del cacao en polvo desgrasado con CO_2 y del polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado).

Tabla 5. 4. Valores medios de flavanoles (mg/g muestra p.s.) y capacidad antioxidante (método ORAC) en muestras de cacao en polvo desgrasado con CO_2 y polvo de cacao convencional.

	FLAVANOLES					**ORAC** (µmol TE/g)
Muestra	**(-)-Epicatequina**	**(+)-Catequina**	**Procianidina B1**	**Procianidina B2**	**Suma Flavanoles**	
Cacao en polvo desgrasado CO_2	17,9 (0,3)	2,4 (0,5)	1,4 (0,1)	14,0 (0,6)	**35,6 (0,7)**	**1662**
Polvo de cacao convencional	1,9 (0,5)	0,51(0,06)	0,083 (0)	1,0 (0,2)	**3,5 (0,8)**	**686**

Resultados son la media de dos repeticiones (n=2) entre paréntesis la desviación estándar.

La **Figura 5.4.** muestra la superposición del cromatograma obtenido con el cacao desgrasado con CO_2 supercrítico y el polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado) por HPLC-DAD.

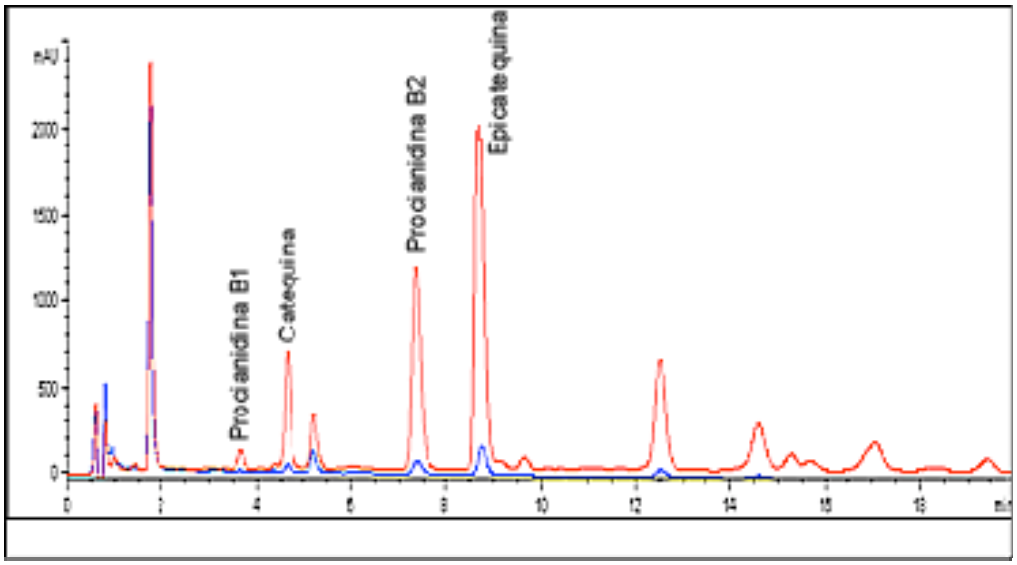


Figura 5. 4.

Cromatograma obtenido por HPLC-DAD (λ =280 nm) en el polvo de cacao desgrasado con CO_2 supercrítico (color rojo) y polvo de cacao convencional (color azul).

El método de análisis ha permitido la separación y cuantificación de la procianidina B1, (+)-catequina, procianidina B2 y (-)-epicatequina en un tiempo de 10 minutos. El compuesto mayoritario cuantificado, tanto en el polvo de cacao desgrasado con CO_2 supercrítico como en el polvo convencional, fue la (-)-epicatequina, seguido de la procianidina B2, (+)-catequina y procianidina B1; con valores medios de 17,9; 14; 2,4 y 1,4 mg/g, respectivamente, para el caso del cacao desgrasado con CO_2 supercrítico y valores medios de 1,9; 1,0; 0,51; y 0,083 mg/g respectivamente, para el caso del polvo convencional.

El perfil de flavanoles del cacao desgrasado con CO_2 supercrítico, equivale cualitativamente al del polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado) obtenido por el procedimiento tradicional. Si bien, tal y como se buscaba, hay un mayor contenido de flavanoles debido al cuidado procesamiento y a la inactivación de la enzima PPO conseguida en el proceso de escaldado del grano, responsable de la desgradación de los (poli)fenoles en el proceso tradicional.

Como se observa en los resultados mostrados en la **Tabla 5.4.** hay un mayor enriquecimiento de todos los compuestos analizados (catequina, epicatequina y procianidinas B1 y B2) en el nuevo prototipo de cacao respecto al polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado). Lo que confirma cómo todas las etapas de elaboración de un polvo de cacao convencional; desde la fermentación, secado, tostado y prensado, conducen a una notable degradación del contenido de (poli)fenoles.

Así, según los datos mostrados, la concentración de (-)-epicatequina en el cacao en polvo desgrasado con CO_2, fue 9,5 veces superior al del polvo de cacao convencional; la concentración de catequina 5 veces superior; la de procianidina B1, 17 veces superior y la procianidina B2, 14 veces superior.

El contenido de (-)-epicatequina cuantificado por HPLC-DAD en el cacao desgrasado hasta el 7% con CO_2 supercrítico, fue de 17,80 mg/g, valor próximo a los 20 mg/g cuantificado por Kattenberg & Willemsen, (2003) en sólidos de cacao obtenidos a partir de semillas con la enzima PPO inactivada, descascarillados, desgrasados hasta el 11% con *expeller* y molidos a un tamaño de partícula de 1 mm.

Por otro lado, se analizó la capacidad antioxidante del prototipo desarrollado a escala piloto por el método ORAC, así como del polvo de cacao natural convencional, contrastando ambos valores. El valor de ORAC del prototipo de cacao en polvo desgrasado con CO_2 supercrítico desarrollado a escala piloto fue de 1662 µmol equivalentes de trolox por gramo de muestra mientras que el valor de ORAC del polvo de cacao

convencional fue de 686 µmol equivalentes de trolox por gramo de muestra. El nuevo prototipo desarrollado dio un valor de ORAC 2,5 veces superior al valor de ORAC de un polvo de cacao convencional, con lo que el nuevo prototipo sería considerado como uno de los alimentos de alta actividad antioxidante (Wu *et al.,* 2004).

Los resultados confirman que esta tecnología podría ser adecuada para desgrasar polvo de "nibs" de cacao no fermentado, y conseguir desgrasar la materia prima inicial hasta un contenido graso aproximado del 6%, si bien, la granulometría del producto que va a ser desgrasado con esta tecnología es un factor clave para que el rendimiento de la extracción sea apropiado. En el caso del cacao, debido al elevado porcentaje de grasa que contiene, es necesario realizar una molienda criogénica previa, para mantener el estado de polvo y que no se forme una pasta. Esta molienda previa, sería un proceso a añadir para la obtención del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles respecto del proceso tecnológico tradicional de fabricación de polvo de cacao. Proceso que dificultaría su fabricación industrial, por los elevados costes de procesado.

5.4. CONCLUSIONES

El prototipo de cacao en polvo desgrasado (prototipo A), obtenido a partir de semillas liofilizadas de Ecuador y empleando dietiléter durante 16 horas a 55 ºC, es el prototipo con el que se ha obtenido la mayor concentración de (poli)fenoles totales, seguido del cacao en polvo desgrasado obtenido a partir de semillas con la PPO inactivada (prototipo E).

Por otro lado, el elevado contenido de (poli)fenoles totales obtenidos en el prototipo de cacao en polvo desgrasado (prototipo E), a partir de semillas con la enzima PPO inactivada, en comparación con los prototipos C y D, ponen de manifiesto que el secado y el desgrasado no afectaron al contenido de (poli)fenoles en comparación a la materia prima de partida

debido a la inactivación de la enzima PPO. Por ello, el prototipo E ha sido considerado como el prototipo óptimo para escalarlo a nivel piloto.

El proceso de desgrasado con CO_2 supercrítico permite preservar el contenido de (poli)fenoles totales y flavanoles, así como la capacidad antioxidante en el cacao en polvo desgrasado a escala piloto a partir de cacao con la enzima PPO inactivada, en comparación a los valores encontrados en un polvo de cacao convencional. No obstante, la tecnología de desgrasado de cacao empleando CO_2 supercrítico, requiere una granulometría de producto óptima, que se consigue a través de una molienda criogénica previa, proceso que encarece el coste del producto final.

CAPÍTULO 6

Desarrollo industrial de un ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles

6.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El paso previo al procesado industrial de las semillas de cacao para la producción de polvo de cacao, es la limpieza y eliminación de materiales extraños que se recogen junto al cacao, y que constituyen peligros físicos en el producto a la vez que pueden ser fuente de contaminación con microorganismos patógenos o alterantes.

Las semillas de cacao tienen microorganismos dentro de los cotiledones que constituyen el grupo de microorganismos alterantes típico de este fruto. Durante el proceso tecnológico de tostado y del tratamiento térmico, que oscila desde los 105 a los 150 ºC durante 15 minutos hasta las 2 horas, se eliminan los microorganismos siendo por lo tanto una etapa crítica y la única en el proceso de elaboración de cacao en polvo en la que *Salmonella* y otros microorganismos patógenos pueden ser eliminados de cara a garantizar la seguridad alimentaria del producto final.

Un tratamiento térmico excesivo puede provocar la aparición de compuestos indeseables, la pérdida de nutrientes así como una posible reducción de compuestos químicos de interés, provocando una disminución en la calidad del producto. De este modo y como ya se demostró en capítulos anteriores, el proceso de tostado dio lugar a una reducción considerable del contenido de (poli)fenoles en el grano de cacao, debido a que las altas temperaturas durante tiempos prolongados, provocaron la oxidación y degradación de estos compuestos. Por ello, es considerado de gran importancia optimizar los parámetros del proceso de tostado para limitar la pérdida de la fracción (poli)fenólica (Bordiga *et al.,* 2015).

Durante el procesado térmico de un alimento hay que conseguir unas condiciones de calentamiento que nos permita producir productos microbiológicamente seguros, con esterilidad comercial y de calidad aceptable por el consumidor. Los métodos más eficaces y disponibles para la industria son normalmente los tratamientos térmicos de escaldado,

pasteurización y esterilización, seguidos del empleo de radiaciones. Son también bastante mencionados los métodos altamente oxidantes, como los tratamientos con ozono (Güzel-Seydim *et al*., 2004). El gran desafío de estos últimos, sería mantener las características químicas del producto tratado, evitando que la oxidación pudiera alterar la composición inicial del producto y sus propiedades organolépticas.

Por todo ello, es de gran interés encontrar un método alternativo al tostado de las semillas de cacao que permita, por un lado, obtener un producto seguro teniendo en cuenta las especificaciones microbiológicas de un polvo de cacao para su comercialización y por otro, que garantice mínimas pérdidas de (poli)fenoles.

Existen en la bibliografía procedimientos en los que se describe el procesado de semillas de cacao para elaborar polvo de cacao que reducen las pérdidas de los compuestos fenólicos inicialmente presentes en el grano fresco. Kealey *et al.* (1996) describieron la técnica para elaborar un sólido de cacao (polvo parcialmente desgrasado derivado del cacao) en el cual el perfil de procianidinas no cambió substancialmente comparado al de la materia prima. El proceso tomó como materia prima un grano de cacao que fue seleccionado según la variedad y el nivel de fermentación (evaluado en función del color de la semilla). El proceso comenzó con un tratamiento térmico del grano de cacao, por medio de rayos infrarrojos a 100-110 ºC; a continuación el grano fue descascarillado, molido, parcialmente desgrasado por *expeller* y finalmente molido otra vez. Opcionalmente este polvo de cacao pudo ser alcalinizado. Posteriormente, estos mismos autores incluyeron en la descripción, el proceso de tostado del grano de cacao (Kealey *et al.,* 1998). En cuya patente se detallan los contenidos de procianidinas encontrados en los productos intermedios y finales. Otros autores como Tanaka *et al.* (1999) obtuvieron un polvo de cacao con un contenido en (poli)fenoles del 7 al 9% y con un sabor menos astringente que el cacao convencional. El proceso que describieron para reducir el amargor del cacao, sin disminuir la cantidad de (poli)fenoles en las semillas del cacao comprendía una serie de etapas secuenciales, como son el descascarillado

del grano, alcalinizado del “nib”, tostado, molienda, prensado de la pasta para extraer la grasa y pulverización final del polvo de cacao. Por otro lado, Kelm *et al.* (2006) obtuvieron un extracto rico en procianidinas a partir de un proceso que minimizaba la degradación de los compuestos oligoméricos. En dicho proceso, las semillas frescas de cacao fueron lavadas para eliminar la pulpa, secadas y prensadas por *expeller* para eliminar la manteca de cacao. La torta de cacao obtenida, fue molida previo a su extracción.

Dependiendo de las condiciones de recolección y del procesado industrial del cacao, puede llegar a conseguirse en el producto final (polvo de cacao, chocolate...) un contenido mayor de (poli)fenoles (Bordiga *et al.*, 2015). Evidentemente, poder mejorar estos procesos a nivel industrial puede permitir aumentar el porcentaje de (poli)fenoles en el producto final desarrollado. Siendo una ventaja del producto rico en (poli)fenoles su posible aplicación en la industria de alimentos como ingrediente funcional.

Cuanto más alto sea el contenido de (poli)fenoles en el ingrediente de cacao desarrollado, más fácil será alcanzar la dosis necesaria para poder conseguir las propiedades saludables tras su ingesta, ya que proporcionar una cantidad suficiente de estos compuestos en la dieta es un punto crítico a la hora de esperar unos posibles efectos beneficiosos tras su consumo. Además, la cantidad de ingrediente rico en (poli)fenoles que podrá ser incorporado en una aplicación final, será menor cuanto mayor sea su concentración de (poli)fenoles, por lo que el ingrediente alterará en menor medida el perfil organoléptico de la matriz alimentaria a la que se añada.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el objetivo de este capítulo ha sido:

(i) estudiar cómo puede afectar la aplicación de un tratamiento térmico, alternativo al tostado, en un producto intermedio de cacao con la finalidad de conseguir las especificaciones microbiológicas de comercialización del polvo de cacao, evaluando el efecto de dicho tratamiento sobre el contenido de (poli)fenoles totales del cacao.

(ii) diseñar un nuevo proceso de desarrollo industrial para la obtención de un ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles y caracterizar su perfil de flavanoles.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. Tratamiento térmico alternativo al tostado de un producto intermedio.

6.2.1.1. Desarrollo industrial de torta de cacao 10-12% grasa.

Para la elaboración de la torta de cacao rica en (poli)fenoles y con un contenido graso del 10-12%, se procesaron 13 toneladas de grano de cacao de la variedad clon CCN 51 de Ecuador, no fermentado escaldado a 95 ºC durante 5 minutos.

La primera operación que se realizó fue la limpieza del grano para eliminar mediante un sistema de aspiración restos de cuerdas y de leña. También, fueron eliminadas en una deschinadora piedras y otras partículas extrañas que se recolectan junto al cacao. A continuación tuvo lugar el descascarillado industrial del grano para eliminar la cascarilla y obtener los “nibs” de cacao. Para separar la cáscara del “nib” en primer lugar se procedió a un proceso de rotura del grano seguido de un tamizado con aspiración de la cáscara.

El desgrasado parcial de los fragmentos de “nibs” de cacao, fue realizado en continuo con un sistema mecánico de prensado por torsión utilizando *expellers*. El equipo constaba de dos artesas o precalentadores en los que se precalentaba el producto a la temperatura prefijada de 55 ºC; y de dos *expeller* o prensas, una para la primera prensada de los “nibs” desde su contenido graso inicial hasta aproximadamente el 20% de grasa; y la otra

para la segunda prensada del producto, desde aproximadamente el 20% de grasa hasta el 10-12% de grasa. Tras el desgrasado se obtuvo por un lado la torta de cacao rica en (poli)fenoles, con un contenido graso del 10-12%, y por otro lado la manteca de cacao. Hay que destacar que tras aplicar este proceso la torta de cacao, no alcanzó temperaturas superiores a los 60 ºC a la salida de los *expeller*.

6.2.1.2. Tratamiento de calor de la torta de cacao 10-12% grasa.

Debido a la propiedad termolábil de los (poli)fenoles y teniendo en cuenta los requerimientos microbiológicos recogidos en las especificaciones de un polvo de cacao para su comercialización, el proceso de esterilización comercial escogido para la torta de cacao con un 10-12% de grasa, fue un tratamiento de calor vía húmeda caracterizado por someter al producto a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. El estudio del tratamiento de calor se realizó a escala de laboratorio y externamente en la empresa SteamLab (Hamburgo, Alemania).

Para el tratamiento térmico, se partió de aproximadamente 4 kilos de la torta de cacao 10-12% de grasa, que fueron molidos en un molinillo eléctrico hasta obtener un polvo fino. El polvo, fue tamizado empleando un tamiz de luz de malla de 0,5 mm. Los 4 kilos de torta de cacao molida, fueron colocados sobre unas bandejas horizontales y se introdujeron en autoclave con vapor saturado en dos fases. El primer tratamiento térmico que se aplicó sobre 2 kilos de torta de cacao fue de 121 ºC durante 30 segundos. El segundo tratamiento aplicado sobre los restantes 2 kilos de torta molida, fue de 121 ºC durante 1 minuto. Finalmente, el producto tratado térmicamente fue molido a un polvo fino.

6.2.2. Diseño y desarrollo industrial del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles.

En este capítulo se introdujeron diferentes cambios en el procesado convencional de los granos de cacao hacia la obtención de un ingrediente de cacao desgrasado. La **Figura 6. 1.** muestra el diagrama del proceso que se ha seguido para la obtención industrial del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles.

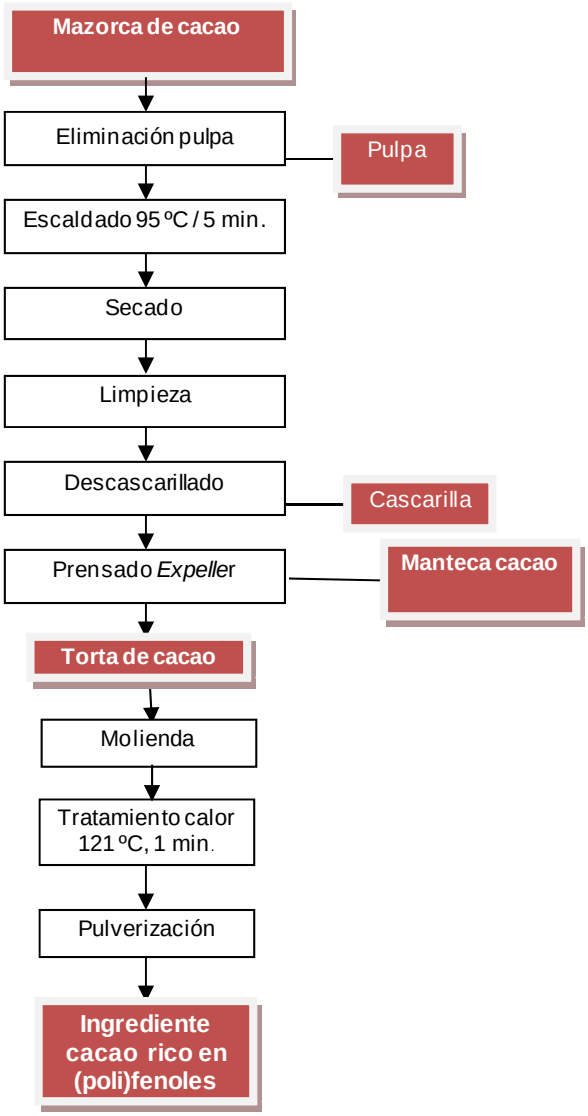


Figura 6. 1.

Diagrama del proceso industrial de producción del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles.

La materia prima para la elaboración del ingrediente de cacao con alto contenido en (poli)fenoles, fueron semillas frescas no fermentadas obtenidas directamente del fruto o mazorca de cacao. Como producto de partida más indicado para el proceso, por su elevado contenido en (poli)fenoles, se seleccionó el clon CCN-51 procedente de la región de Quevedo, en Ecuador. El triple híbrido procedía del cruce del clon amazónico IMC67 con el clonTrinitario ICS95, el cual a su vez fue cruzado con el genotipo Canelo Amazónico regional de la zona de Quevedo **(Figura 6.2.)**.

Figura 6. 2.

Plantación de cacao Clon CCN51 en Ecuador.

Las mazorcas de cacao una vez recolectadas en Ecuador, fueron abiertas separando de forma manual la pulpa y las semillas frescas no fermentadas. El grano fresco fue enfriado manteniéndolo en agua a 15 ºC para evitar la fermentación inicial y las reacciones de oxidación enzimática. Inmediatamente después, el grano sin pulpa fue escaldado en agua hirviendo, a 95 ºC durante 5 minutos. Cargas de 150 kilos de grano fresco fueron escaldadas en 490 litros de agua empleando una olla y agitando la masa de cacao **(Figura 6.3 A).** Después del escaldado, se escurrieron y

enfriaron los granos de cacao pasándolos por un chorro de agua fría **(Figura 6.3.B y 6. 4. A)**.

A B

Figura 6. 3.

A: Carga de grano fresco de cacao para el proceso de escaldado (95 ºC/ 5 min) **B:** Escurrido del grano después del escaldado.

A B

Figura 6. 4.

A: Enfriamiento del grano de cacao**. B:** Extensión del grano de cacao para el secado en patio.

El grano de cacao con la enzima PPO inactivada, fue extendido y secado en patio a temperatura ambiente durante 4 días, hasta alcanzar un contenido de humedad final entre el 5 y el 7% **(Figura 6.4. B y 6.5.)**.

Figura 6. 5.

Secado en patio del grano con la enzima PPO inactivada en Ecuador.

El grano seco fue ensacado en sacos de yute de 65-70 kilos y transportado en contenedores de 20 pies, hasta la planta industrial de producción (Natraceutical, Valencia). Una vez en la planta, el grano de cacao no fermentado secado y con la enzima PPO inactivada, fue almacenado en bolsas de 800 kilos, en ambiente seco, ventilado y protegido de la luz.

Se procesaron en total 20 lotes de grano de cacao no fermentado con la enzima PPO inactivada, que presentaron un contenido medio de (poli)fenoles totales superior a 7 g/100g, determinados espectrofotométricamente por el método de Folin-Ciocalteu, en “nib” de cacao y expresado en peso seco.

Una vez en la planta industrial, el grano de cacao fue procesado tal y como se describe en el apartado **6.2.1.1**. para la obtención industrial de la torta de cacao 10-12% de grasa. La torta de cacao con un contenido graso inferior al 12% obtenida a la salida del *expeller* fue enfriada a una

temperatura inferior a 30 ºC. A continuación fue molida a un tamaño de partícula de 500 micras empleando un molino de martillos. El producto fue ensacado en bolsas de 800 kilos. A continuación, se realizó el tratamiento industrial de calor de la torta de cacao descrito en el apartado **6.2.1.2.**

Cargas de 350 kilos de producto fueron puestos sobre unas bandejas horizontales y metidas en un autoclave industrial donde tuvo lugar la esterilización del polvo por corriente de vapor. El tratamiento de calor aplicado fue de 121 ºC durante 1 minuto. Se realizó externamente en la empresa SteamLab (Hamburgo, Alemania)

Después del tratamiento térmico el producto quedó aglutinado mostrando un aspecto sólido en “bloque”, con lo que fue necesaria una fragmentación de la torta y una molienda final. Para ello se empleó un molino de cuchillas y de esta forma se obtuvo un polvo con un tamaño de partícula inferior a 4 mm. Para la micronización final del polvo se empleó un molino clasificador obteniéndose el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles con un tamaño de partícula inferior a 75 micras. El ingrediente final fue ensacado en sacos de papel de 25 kilos.

6.2.3. Determinación de (poli)fenoles totales.

Los (poli)fenoles totales en “nib” de grano de cacao con la enzima PPO inactivada y en la torta de cacao obtenida, así como en los 20 lotes de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu descrito en el **Capítulo 3**. Para la cuantificación se empleó ácido gálico monohidratado (Scharlab, Barcelona, España).

6.2.4. Determinación del contenido graso.

La cuantificación del contenido graso de la muestra de torta de cacao y del grano de cacao rico en (poli)fenoles, se llevó a cabo de acuerdo al método de Soxhlet descrito en el **Capítulo 5.**

6.2.5. Capacidad antioxidante (método ORAC).

La medida de capacidad antioxidante del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, se realizó por el método ORAC (Cao *et al*., 1993). El valor de ORAC fue expresado como micromoles de equivalentes de trolox por gramo de sustancia. La medida de la capacidad antioxidante fue realizada en un laboratorio externo (Brunswick, USA).

6.2.6. Análisis de flavanoles por HPLC-DAD.

Para el análisis de los flavanoles en 5 lotes de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles se cuantificaron los monómeros de (+)-catequina, y (-)-epicatequina así como los dímeros de procianidina B1 y procianidina B2 por HPLC-DAD de acuerdo a la metodología descrita en el **Capítulo 4**.

6.2.7. Análisis de procianidinas por HPLC-MS.

La cuantificación de las fracciones de procianidinas (de monómeros a decámeros incluidos los polímeros) por HPLC-MS se realizó en un laboratorio externo (Brunswick, USA). El proceso de extracción de las

procianidinas fue realizado siguiendo la metodología descrita por Gu *et al*. (2006) con alguna modificación.

Muestras de 1 g de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, fueron extraídas con 10 mL de una solución de extracción (acetona/agua/ácido acético) en proporciones 70:29,5:0,5 (v/v/v). La mezcla se agitó en un baño de ultrasonidos a 37 ºC durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 1600 *g* durante 15 minutos decantándose el sobrenadante. El proceso de extracción se repitió dos veces más juntando los sobrenadantes y evaporando el solvente hasta sequedad. A continuación se disolvió la muestra seca en el mismo solvente de extracción, filtrando el extracto con un filtro de polipropileno de 0,45 µm antes de ser inyectado en la columna para su análisis por HPLC-MS en fase normal.

La cuantificación e identificación de las fracciones de procianidinas de los extractos fue realizada de acuerdo al método descrito por Gu *et al.* (2006). Los resultados fueron expresados en mg/g de ingrediente en peso húmedo.

6.2.8. Determinación de la humedad.

Ha sido necesaria la determinación de la humedad de las muestras para referir los resultados de (poli)fenoles totales y flavanoles a materia seca. La humedad fue determinada por desecación en estufa de aire caliente hasta alcanzar el peso constante según se describe en el **Capítulo 3**.

6.2.9. Análisis microbiológico.

El análisis de los microorganismos aeróbios mesófilos, mohos y levaduras, Enterobacterias, *Escherichia coli* y *Salmonella* de las muestras de cacao, antes y después del tratamiento, fue realizado por el departamento de control de calidad de la empresa Natraceutical (Valencia).

6.2.9.1. Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos.

"Plate Count" Agar (PCA, Scharlab, España) fue empleado como medio de cultivo para el análisis de los microorganismos aerobios totales, incubando las placas a 37 ºC durante 48 horas. Se realizaron diferentes diluciones decimales y para realizar el contaje se seleccionaron las placas con un número de colonias entre 30 y 300. Tras el recuento de las colonias de cada placa, los resultados medios fueron expresados como unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (ufc/g).

6.2.9.2. Enterobacterias.

Agar Violeta Rojo Bilis con Glucosa (VRBG, Scharlab, España) fue empleado como medio de cultivo para el análisis de Enterobacterias, incubando las placas a 37 ºC durante 24 horas. Se realizó el recuento de todas las colonias de cada placa expresando los resultados como unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (ufc/g).

6.2.9.3. Mohos y Levaduras.

Agar base Rosa de Bengala-Cloranfenicol fue empleado como medio de cultivo para el análisis de mohos y levaduras, incubando las placas sin invertirlas a 25 ºC durante 5 días. Se realizó el recuento de todas las

colonias de cada placa expresando los resultados como unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (ufc/g).

6.2.9.4. *E. coli.*

El Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (LB) fue empleado para el aislamiento y cuantificación de *E. coli*. Las muestras fueron inoculadas en los tubos de ensayos con el caldo y con una campana de Durham. Los tubos se incubaron en la estufa a 37 ºC durante 24 horas observando la presencia de gas en el interior de las campanas. Con un asa de siembra estéril se tomó muestra de los tubos positivos y se sembraron en placas petri que contenían agar ENDO. Las placas se incubaron a 37 ºC durante al menos 24 horas para la confirmación de la presencia de coliformes. Los coliformes consumen lactosa formando aldehído y ácido. El aldehído libera fucsina que da una coloración roja a las colonias y en el caso de *E. coli* la fucsina llega a cristalizar confiriendo un brillo metálico a las colonias. Estas colonias serían consideradas presuntas *E. coli.* Los resultados se expresaron como presencia o ausencia en 25 g de producto.

6.2.9.5. *Salmonella.*

Se pesaron asépticamente 25 g de muestra y se añadieron 225 mL de leche desnatada. Se incubó a 37 ºC durante 16-24 horas para el preenriquecimiento del caldo de cultivo. Tras agitar el cultivo de preenriquecimiento se sembró con pipeta estéril 1 mL de cultivo sobre 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, incubándose a 42 ºC durante 18-24 horas. A partir del cultivo obtenido, se sembró con asa estéril en un medio sólido Agar selectivo Rambach (Merck, España) y se incubó a 37 ºC durante 24-48 horas. En este medio de cultivo selectivo, la presencia de especies del género *Salmonella* se pone de manifiesto por la aparición de colonias típicas rojas. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia en 25 g de producto.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Tratamiento térmico alternativo al tostado del producto intermedio.

6.3.1.1. Desarrollo industrial de torta de cacao 10-12%.

En esta experiencia se obtuvo a escala industrial una torta de cacao con un 10-12% de grasa, preparada a partir de un grano de cacao no fermentado y con la enzima PPO inactivada, procedente del clon CCN 51 de la región de Quevedo en Ecuador. El proceso de desgrasado de los “nibs” de cacao obtenidos tras el desacascarillado, se realizó mediante un prensado por *expellers* con una temperatura controlada de 55 ºC.

La **Tabla 6.1.** muestra el contenido de grasa, contenido de (poli)fenoles totales analizados por método de Folin-Ciocalteu, la humedad del grano o “nib” y de la torta de cacao a la salida de los expellers.

Tabla 6. 1. Valores medios de contenido graso (g/100 g muestra p.s.), (poli)fenoles totales (g/100g muestra p.s.) y humedad (g/100g muestra) en muestra de “nibs” y torta de cacao 10-12%.

MUESTRA	Contenido graso	(Poli)fenoles totales[a]	Humedad
“Nib” semillas PPO inactivadas (clon CCN 51)	42,4 (1,2)	10,4 (0,2)	6,5 (0,3)
Torta de cacao 10-12%	9,9 (1,0)	18,3 (0,1)	7,8 (1,8)

[a]Resultados expresado como equivalente de ácido gálico en peso seco. Resultados de (poli)fenoles totales, contenido graso y humedad, son la media de dos repeticiones (n=2) y entre paréntesis la desviación estándar.

El contenido de manteca de cacao cuantificado en el “nib” de cacao procedente del clon CCN51 fue del 42%. Después del proceso de prensado en *expeller* a temperatura prefijada de 55 ºC, se ha conseguido obtener una torta de cacao con un contenido graso de 9,9 g/100 g y humedad de 7,8 g/100 g.

El contenido de (poli)fenoles totales que se obtuvo en la torta de cacao fue de 18 g/100 g (equivalentes de ácido gálico), coincidiendo con el valor teórico esperado, después de eliminar un 42% de su contenido graso, ya que el desgrasado incrementa proporcionalmente el residuo magro donde se encuentran los (poli)fenoles. Con los resultados obtenidos, podemos considerar que este proceso preserva por tanto el contenido inicial de (poli)fenoles presentes en las semillas o “nibs” de cacao, ya que no se observaron pérdidas de (poli)fenoles totales en la torta de cacao, respecto a su materia prima, cuando las temperaturas del proceso de desgrasado con *expellers* estaban entre los 55 y 60 ºC. La diferencia fundamental con las prensas hidráulicas del proceso convencional, radica en que en estas últimas la pasta de cacao es calentada entre los 90 y 100 ºC, con la consecuente pérdida de (poli)fenoles por las elevadas temperaturas.

6.3.1.2. Tratamiento con calor húmedo de torta de cacao molida.

La principal diferencia del tratamiento con calor húmedo respecto a un proceso térmico convencional, fue la elevada temperatura que se alcanzó durante un corto periodo de tiempo, que garantiza menores pérdidas de compuestos bioactivos en la torta de cacao, respecto a las pérdidas que se producen durante el proceso convencional de tostado del grano tal y como han descrito otros autores (Afoakwa *et al*. (2015); Bordiga *et al.,* 2015; Wollgast *&* Anklam, (2000).

Para esta experiencia se aplicaron dos tipos de tratamiento en función de la duración, uno de 30 segundos y otro de 1 minuto, ambos a 121 ºC. El tratamiento de calor con una duración de 30 segundos, fue un tratamiento

heterogéneo ya que el corto periodo de tiempo del proceso no aseguró que la corriente de vapor atravesase el grosor de la capa, y por tanto, se alcanzara la temperatura deseada en las partículas del ingrediente de cacao en polvo. Este tratamiento se consideró inefectivo, por lo que se incrementó el tiempo de aplicación de vapor hasta alcanzar 1 minuto.

La **Tabla 6.2.** muestra los resultados de (poli)fenoles totales por Folin-Ciocalteu y perfil del flavanoles por HPLC-DAD en la torta de cacao molida, antes y después del tratamiento de calor a 121 ºC durante 1 minuto.

Tabla 6. 2. Valores medios de (poli)fenoles totales (g/100g) y flavanoles (mg/g) medidos en la torta de cacao molida y en la torta de cacao tratada a 121 ºC durante 1 minuto.

Compuesto	Torta de cacao molida (antes del tratamiento)	Torta de cacao molida (después del tratamiento 121ºC/1min)
(Poli)fenoles totales[(a)]	16,5 (0,3)	16,4 (0,0)
(+)- Catequina[(b)]	4,5 (0,0)	4,0 (0,3)
(-)- Epicatequina[(b)]	21,0 (0,2)	20,5 (0,7)
Procyanidin B1[(b)]	1,1 (0,2)	0,51 (0,62)
Procyanidin B2[(b)]	12,5 (0,3)	12,9 (0,6)
Suma flavanoles	**39,1 (0,4)**	**37,9 (0,4)**

[(a)](Poli)fenoles totales medidos por el método de Folin-Ciocalteu, resultados expresados como equivalentes de ácido gálico y en peso seco. [(b)] Perfil de flavanoles medidos por HPLC-DAD, resultados expresados en peso seco. Resultados son la media de dos repeticiones (n=2) entre paréntesis la desviación estándar.

Los resultados recogidos en la **Tabla 6.2.** mostraron que no se observaron diferencias en el contenido de (poli)fenoles totales y flavanoles del polvo de cacao antes y después del tratamiento térmico, por lo que no se producen pérdidas ni en el contenido total de estos compuestos, ni en los

contenidos individuales de (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2 después del tratamiento de la torta de cacao en autoclave con calor húmedo a 121 ºC durante 1 minuto.

Bordiga *et al.* (2015) observaron un efecto negativo del tostado en el contenido de (poli)fenoles totales y en el contenido de (-)-epicatequina, procianidina B1 y procianidina B2, al observar que se producía una disminución significativa en el contenido de dichos compuestos cuando se compararon “nibs” de cacao de Ecuador sin tostar con “nibs” de cacao tostados. En efecto, el procesado térmico de las semillas de cacao resulta en una reducción del contenido de (poli)fenoles en las muestras (Wollgast *&* Anklan, 2000). Esta pérdida puede ser mejorada controlando la temperatura y el tiempo de tratamiento en los tostadores ya que aparte del desarrollo de las reacciones de Maillard, la oxidación de los compuestos fenólicos y su participación en algunas reacciones químicas como la formación de complejos de alto peso molecular, reducen de forma significativa su contenido (Bordiga *et al*., 2015). Afoakwa *et al*. (2015) observaron que a medida que se incrementaba el tiempo del proceso de tostado se producía una disminución significativa del contenido de (poli)fenoles totales en semillas de cacao así como una disminución significativa en el contenido de *o*-difenoles después del tostado a 120 ºC durante 45 minutos.

Para evaluar si el tratamiento térmico cumplía los criterios microbiológicos para asegurar la inocuidad del producto se realizaron diversos análisis microbiológicos sobre la torta de cacao molida antes y después del tratamiento a 121 ºC durante 1 minuto. Los resultados obtenidos vienen recogidos en la **Tabla 6.3.**

Tabla 6.3. Análisis microbiológicos de la torta de cacao molida antes y después del tratamiento a 121 ºC durante 1 minuto.

	Torta de cacao molida (antes del tratamiento)	Torta de cacao molida (después del tratamiento 121ºC/1min)
Microorganismos aerobios mesófilos	Incontable	<100 ufg/g
Mohos y Levaduras	Incontable	<10 ufc/g
Enterobacterias	<10 ufc/g	<10 ufc/g
E. Coli/g	Ausencia	Ausencia
Salmonella/25g	Ausencia	Ausencia

ufc/g: unidades formadoras de colonia/gramo.

El tratamiento a 121º C durante 1 minuto fue capaz de reducir el recuento de aerobios mesófilos y de mohos y levaduras existentes inicialmente en la torta de cacao molida, preservando la calidad de la torta de cacao y aumentando su vida útil. Además, en ambos productos se observó una ausencia de microorganismos patógenos garantizando la seguridad alimentaria. Por lo tanto, este tratamiento térmico fue apropiado para conseguir la esterilidad comercial en el producto, ya que tras el mismo se alcanzaron las especificaciones microbiológicas definidas para el cacao en cuanto a microorganimos marcadores de la higiene y los microorganismos totales (microorganismos aerobios mesofilos < 5000 ufc/g, mohos y levaduras < 10 ufc/g, enterobacterias < 10 ufc/g, *E. Coli* negativo y *Salmonella* negativo) **(Tabla 6.3.)**.

6.3.2. Desarrollo industrial del ingrediente cacao rico en (poli)fenoles.

La **Figura 6.1.** representa las etapas del proceso que se ha diseñado para obtener el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles. En este nuevo

proceso, se han eliminado o prescindido de determinadas etapas del proceso tradicional de producción de polvo de cacao; como fue la fermentación, el tostado del grano y el desgrasado por prensado hidráulico. Por otro lado, se incorporaron otros procesos habituales en la industria alimentaria que evitan en gran medida la reducción de los compuestos fenólicos inicialmente presentes en el grano de cacao, como fue el escaldado del grano de cacao a 95 ºC durante 5 minutos, para inactivar a la enzima PPO, el desgrasado por prensado en *expellers* a temperatura baja controlada, y el tratamiento de calor por corriente de vapor en autoclave a 121 ºC durante 1 minuto, para conseguir la esterilidad comercial.

En la **Figura 6.6.** se muestran los valores medios de procianidinas cuantificados en los 20 lotes de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles en función de su grado de polimerización, desde monómeros hasta decámeros incluidos los polímeros.

Las procianidinas, de monómeros a decámeros y polímeros, fueron medidas por cromatografía líquida en fase normal de acuerdo al método descrito por Gu *et al*. (2006) con una ligera modificación en el proceso, ya que se llevó a cabo la extracción sin el proceso de purificación. Según Rigaud *et al.* (1993) el compuesto mayoritario en las semillas de cacao es la (-)-epicatequina y sus oligómeros enlazados hasta los pentámeros. Por otro lado, Kealey *et al*. (1998) detectaron procianidinas de cacao desde monómeros hasta decámeros encontrando valores de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros de 21,9; 10; 10; 7,8 y 5,3; mg/g respectivamente, en un polvo de cacao desgrasado con hexano y obtenido a partir de semillas no fermentadas liofilizadas. También, publicaron valores totales de procianidinas oligoméricas (desde monómeros a octámeros) de 33 mg/g, para un sólido de cacao parcialmente desgrasado por *expeller* y obtenido a partir de grano no fermentado tratado por infrarrojos.

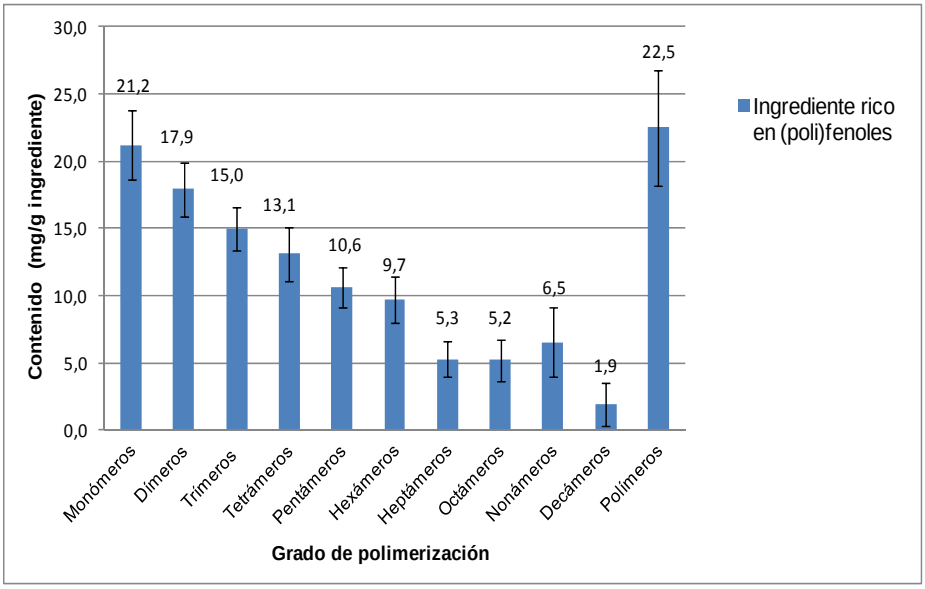


Figura 6. 6.

Diagrama de composición de procianidinas según su grado de polimerización (monómeros hasta polímeros), analizado en 20 lotes de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles. Cada columna representa la media de 20 lotes (n=20) y las barras de error la desviación estándar.

Misnawi *et al.* (2003) mostraron valores de procianidinas desde monómeros hasta pentámeros en un polvo de cacao producido a partir de semillas no fermentadas, descascarilladas, liofilizadas, molidas a un tamaño de partícula < 0,5 mm y desgrasadas por Soxhlet. Siendo los valores publicados para la fracción de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros de 19; 5,9; 13; 7,6 y 5,4 mg/g respectivamente.

En este estudio, los valores medios de procianidinas hallados en los 20 lotes del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, han mostrado unos contenidos de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros de 21; 18; 15; 13 y 11 mg/g, respectivamente. Donde las fracciones mayoritarias fueron los monómeros hasta los hexámeros **(Figura 6.6.)**. El

contenido medio cuantificado para la fracción de monómeros, trímeros y tetrámeros, fue similar a los publicados por Kealey *et al*. (1998) y Misnawi *et al*. (2003) para un polvo de cacao no afectado por variables postcosecha. Si bien, hay que destacar que en el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, otra fracción mayoritaria cuantificada fueron los polímeros o procianidinas con grado de polimerización mayor a las 10 unidades (**Figura 6.6**.). Del mismo modo, hay que destacar que el total de procianidinas oligoméricas (desde monómeros a decámeros) cuantificado en el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles fue 1,7 y 3 veces superior al nivel de procianidinas totales cuantificado por Kealey *et al*. (1998) en un polvo de cacao obtenido a partir de grano fresco no fermentado, liofilizado y desgrasado por Soxhlet, y en un sólido de cacao obtenido a partir de grano no fermentado parcialmente desgrasado por *expeller.* Así como entre 3 y 6 veces más alto que valores de procianidinas publicados para un polvo de cacao convencional (Gu *et al*., 2006; Miller *et al*., 2006). Estas diferencias observadas en el contenido de procianidinas cuantificadas respecto a los sólidos de cacao cuantificadas por Kealey *et al*. (1998) podrían deberse a la variedad de grano seleccionado así como a la etapa de inactivación de la enzima PPO respecto al sólido de cacao obtenido a partir de grano no fermentado, que pudo ser afectado por variables postcosecha. En cuanto a las diferencias observadas con el contenido de procianidinas cuantificadas en un polvo de cacao convencial (Gu *et al*., 2006; Miller *et al*., 2006), éstas podrían deberse tanto al origen del grano seleccionado, como a todas las etapas que afectan a dicho contenido de procianidinas en el proceso tradicional de elaboración de un polvo de cacao convencional, tales como la fermentación del grano, secado, tostado, desgrasado y alcalinizado.

Cuando se analizó el contenido total de (poli)fenoles por la técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu, el contenido medio en los 20 lotes del ingrediente de cacao, fue de 125 ±14 mg/g (equivalentes de ácido gálico, dato no mostrado). Este contenido es significativamente mayor cuando se compara con los valores de (poli)fenoles totales cuantificados en polvos de

cacao de diferentes marcas comerciales producidos por el proceso industrial tradicional, que oscilan desde los 12,9 a los 2,2 mg/g (Purcarea *et al*., 2012).

El cociente (HPLC/Folin) fue calculado en los 20 lotes del ingrediente de cacao, considerando la suma total de las procianidinas y el contendio de (poli)fenoles totales. Para todas las muestras se obtuvo un valor entorno a 1,0 (datos no mostrados) lo cual nos indica que existe una buena aproximación entre la cuantificación de los (poli)fenoles totales según el método de Folin Ciocalteu y el contenido de procianidinas totales cuantificadas por HPLC-MS (Gu *et al*., 2006) para el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles. Estos resultados, en un principio, son de gran interés para la industria ya que nos demuestra que el método de Folin-Ciocalteau, permite analizar de forma rápida los compuestos fenólicos totales presentes en el ingrediente desarrollado, y nos sirve para realizar una primera estimación del contenido de procianidinas totales.

Además de analizar el contenido total de (poli)fenoles se analizaron por HPLC-DAD el perfil de estos compuestos caracterizando cinco lotes de este nuevo ingrediente de cacao. La **Figura 6.7.** representa los valores medios de (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1 y procianidina B2 cuantificados en 5 lotes del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles cuantificados por HPLC-DAD.

El compuesto mayoritario cuantificado fue la (-)-epicatequina con un valor medio de 21,0 mg/g, seguido de la procianidina B2 con un valor de 16,0 mg/g, (+)-catequina con un valor medio de 4,7 mg/g y procianidina B1 con un valor de 1,70 mg/g; siendo el valor de la (-)-epicatequina y (+)-catequina sustancialmente alto cuando se compararon con los valores publicados para otros polvos de cacao naturales obtenidos por el proceso convencional (Roura *et al*., 2007; Andrés-Lacueva *et al*., 2008). Roura *et al.* (2007) publicaron valores de (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B2 de 0,70, 0,64 y 0,21 mg/g, respectivamente en un polvo de cacao convencional comercial. Otros autores han observado que estos valores son variables, con rangos que oscilan para la (-)-epicatequina entre 0,12 y 0,73

mg/g y para la (+)-catequina entre 0,081 y 0,45 mg/g (Andrés-Lacueva *et al*., 2008).

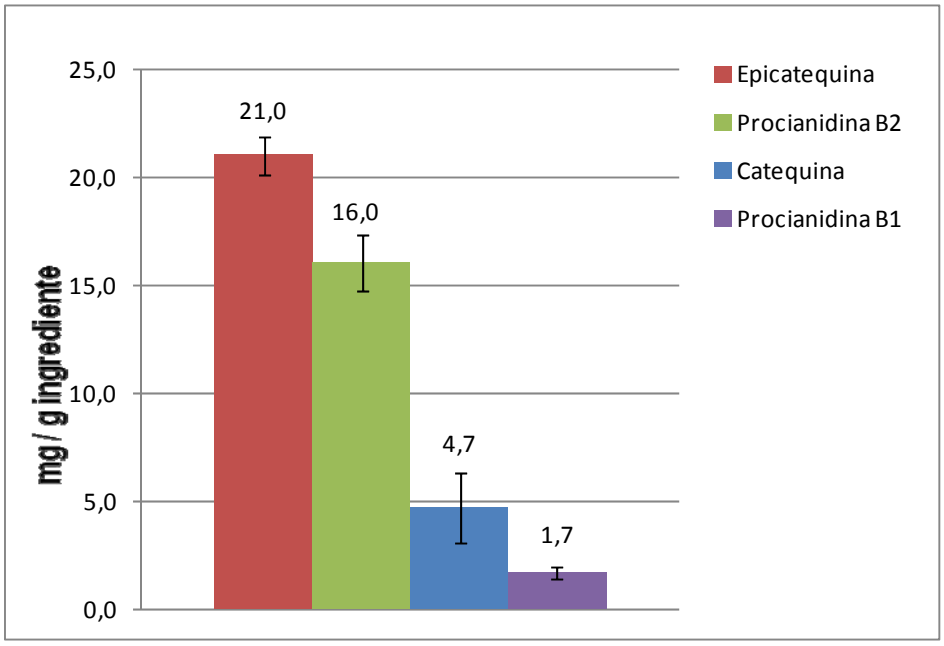


Figura 6.7.

Contenido de (+)-catequina,(-)-epicatequina, procianidina B1 y prociandina B2 analizado en 5 lotes de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles. Columnas son la media de cinco lotes (n=5) y las barras de error, la desviación estándar.

Finalmente, se analizó la capacidad antioxidante por el método ORAC del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles desarrollado a nivel industrial. La medida fue de 2861 µmol equivalentes de trolox por gramo; valor 4 veces más alto que el valor ORAC analizado en un polvo de cacao convencional comercial **(Capítulo 5)** y entre 3-4 veces más alto que valores de ORAC publicados en polvos de cacao de diferentes marcas comerciales (Miller *et al.,* 2009). Estos resultados ponen de manifiesto el valor añadido del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles desarrollado en este estudio.

6.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un procedimiento de procesado de semillas de cacao, alternativo al tradicional, para preservar el contenido de (poli)fenoles evitando la etapa de fermentación y tostado, y añadiendo una etapa de escaldado del grano fresco, para evitar la oxidación de los (poli)fenoles por la PPO; así como un proceso de desgrasado a baja temperatura y un tratamiento térmico con calor húmedo a 121 ºC durante 1 minuto para conseguir la esterilidad comercial, consiguiendo a la vez reducir las pérdidas de flavanoles.

Con este proceso, se ha obtenido un ingrediente de cacao desgrasado con el perfil cualitativo de procianidinas y flavanoles igual al de un polvo de cacao convencional, pero con un contenido en procianidinas oligoméricas superior al de un polvo de cacao convencional. Esto fue debido a que se ha reducido la oxidación de los (poli)fenoles, que ocurre habitualmente durante las diferentes etapas de procesado del cacao, al inactivar a la enzima PPO y reducir las temperaturas de tratamiento convencional.

CAPÍTULO 7

Aplicación de un ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles en la elaboración de un chocolate enriquecido.

7.1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El chocolate es un producto cuyo consumo ha estado desde siempre relacionado con las sensaciones organolépticas agradables que produce su degustación, sin prestar atención a sus propiedades nutricionales y menos aún a sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones enfocadas a la caracterización de los (poli)fenoles, concretamente de los flavonoides presentes en chocolate así como a estudiar las propiedades antioxidantes de estos compuestos y su repercusión en la salud humana.

Waterhouse *et al*. (1996) fueron los primeros en abrir una nueva línea de nutrición y salud asociada a los (poli)fenoles del chocolate. Para ello, cuantificaron el contenido de (poli)fenoles y midieron *in vitro* la capacidad antioxidante en muestras comerciales de chocolate, observando una inhibición del 75% de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) frente al 37-65% de la inhibición observada con el vino tinto. En otro estudio publicado con posterioridad, se demostró que el chocolate posee un gran potencial para mejorar la salud (Dillinger *et al.,* 2000). A partir de entonces surge un enorme interés por las propiedades saludables de los (poli)fenoles del chocolate, y se inicia una amplia investigación sobre sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud relacionados con su capacidad antioxidante y con sus efectos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares y procesos tumorales (Khan *et al*., 2014; Andujar *et al*., 2012; Martín *et al.,* 2013; Serafini *et al.,* 2003).

En relación con la actividad antioxidante, numerosos estudios han confirmado que extractos de diferentes muestras de chocolate y pasta de cacao, tienen una potente capacidad antioxidante y que esta, es proporcional a su contenido en flavonoides (Crozier *et al*., 2011; Redovnikovik *et al*., 2009; Kowalska *&* Sidorczuk, 2007; Gu *et al*., 2006; Miller *et al.,* 2006; Lee *et al.,* 2003). Se ha demostrado que el chocolate negro posee el rango más alto de capacidad antioxidante (120-140 unidades

ORAC por gramo) cuando se comparó con otros alimentos como el brócoli, col, fresas, frambuesas, espinacas, ciruelas y arándanos (Engler, 2004).

Crozier *et al*. (2011) publicaron en chocolate valores de (poli)fenoles totales medidos por Folin Ciocalteu de 1g por ración (40 g), de los cuales, 535 mg eran flavanoles. La elevada capacidad antioxidante del chocolate ha sido atribuida al elevado contenido en flavanoles, y principalmente a la presencia de (-)-epicatequina. Además de los flavan-3-oles (+)-catequina y (-)-epicatequina, y sus dímeros la procianidina B1 y la procianidina B2, que son los compuestos mayoritarios en cacao, también se han identificado y cuantificado trímeros y hasta decámeros de procianidinas (Bordiga *et al*., 2015; Ortega *et al*., 2010; Robbins *et al.,* 2009; Gu *et al.,* 2006; Kelm *et al*., 2006). Dado que los flavan-3-oles son los compuestos mayoritarios en cacao, la mayoría de artículos publicados sobre análisis de (poli)fenoles en cacao y chocolate se han centrado en estos compuestos observándose una gran variabilidad en los niveles hallados.

Esta gran variabilidad del contenido de (poli)fenoles cuantificado en chocolate depende de varios factores, entre los que están todos los mencionados en el **Capítulo 1**, como son el origen y la variedad botánica de cacao, la fermentación y secado del grano así como todos los procesos tecnológicos que conllevan la fabricación del chocolate como el tostado, desgrasado y conchado. También, la proporción de ingredientes base cacao añadido en la elaboración del chocolate, como la pasta y polvo de cacao, afectan a este contenido.

En la actualidad, es imposible para aquellos consumidores que buscan aumentar su consumo de (poli)fenoles a través del consumo de productos derivados del cacao, obtener información sobre los niveles en determinados productos. Para poder conocer los efectos reales del consumo de estos productos es necesario poder caracterizar bien la composición en (poli)fenoles del cacao y sus derivados. Esta caracterización debería incluir una descripción pormenorizada de los tipos de (poli)fenoles, especialmente el contenido de oligómeros e ir acompañando por la metodología utilizada

para el análisis (Rusconi *et al*., 2010).

Por todo ello, se podría considerar de gran interés el conocimiento exacto del perfil cuantitativo y cualitativo de (poli)fenoles en productos como el chocolate desde el punto de vista de su valor funcional y efectos en la salud y por tanto, importante a nivel industrial para obtener productos ricos en estos compuestos.

Kealey *et al*. (1998), fueron los primeros en patentar un proceso para producir a partir de semillas de cacao no fermentadas, sólidos de cacao de elevado contenido en (poli)fenoles y describieron la utilización de estos sólidos como ingredientes en la elaboración de un chocolate negro y un chocolate con leche que mejorara los niveles de (poli)fenoles. Determinaron en el chocolate los valores de procianidinas oligoméricas totales (monómeros a dodecámeros) mediante HPLC en fase normal y detectores de fluorescencia y DAD empleando (-)-epicatequina como estándar externo para su cuantificación. Cuantificaron 14 mg/g de procianidinas en el chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles, y 0,56 mg/g de procianidinas en el chocolate con leche, frente a los 4,0 mg/g de procianidinas cuantificados en un chocolate negro convencional (Miller *et al.,* 2009).

En general, un chocolate de elevado contenido en (poli)fenoles tiene poca aceptación en la industria del chocolate por su sabor astringente y amargo, aunque existen nichos de mercado donde los productos de chocolate con elevados contenidos de (poli)fenoles son buscados por ciertos consumidores debido a sus propiedades beneficiosas sobre la salud (Hii *et al.,* 2009a). Ludwig *et al*. (2008) publicaron una patente que cubre el proceso de microencapsulación de extractos ricos en (poli)fenoles para incrementar de forma significativa su contenido durante la elaboración de un chocolate y al mismo tiempo, reducir la astringencia y amargor en el chocolate manteniendo intactos sus compuestos bioactivos así como su biodisponibilidad gastrointestinal.

Harwood *et al.* (2013) emplearon un polvo de cacao elaborado con semillas no fermentadas para enriquecer el contenido de (poli)fenoles en el

chocolate, evaluando posteriormente el efecto de la adición sobre las características sensoriales. Encontraron que los grupos reaccionaron de manera similar a un aumento en el contenido de flavanoles de un cacao en polvo incorporado en un chocolate.

Por todo ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido desarrollar una formulación de chocolate negro enriquecido en procianidinas derivadas del cacao, procediendo a la completa caracterización del perfil (poli)fenolico, tanto del producto final como de los distintos ingredientes de cacao empleados en su formulación, y compararlo con un chocolate negro no enriquecido, elaborado con las mismas proporciones de ingredientes. Así como la evaluación de la capacidad antioxidante en ambos chocolates.

7.2. MATERIAL Y METODOS

7.2.1. Preparación de muestras.

7.2.1.1. Preparación del ingrediente cacao en polvo rico en (poli)fenoles.

Se fabricó a nivel industrial un lote del ingrediente de cacao en polvo rico en (poli)fenoles como se ha descrito en el **Capítulo 6**. Se seleccionó como materia prima la variedad de grano de cacao Amazónico-Trinitario (Clon CCN-51) de la región de Quevedo en Ecuador, por tener un contenido en (poli)fenoles totales superior a los 7 g/100 g. El fruto fresco de cacao fue industrialmente procesado evitando la fermentación del grano de cacao e incluyendo un proceso de escaldado del grano con agua a 95 ºC durante 5 minutos. Una vez en planta, el grano de cacao con un contenido de humedad aproximado del 6%, fue descascarillado y desgrasado a temperatura controlada (55 ºC) mediante prensado mecánico en continuo

utilizando *expellers*, evitándose el proceso de tostado del grano con el fin de obtener una torta de cacao con un 11% de grasa rica en procianidinas. La torta de cacao fue tratada térmicamente por corriente de vapor a 121 ºC durante 1 minuto en autoclave. Finalmente, esta torta de cacao fue industrialmente molida en un molino clasificador hasta obtener un ingrediente de cacao color purpura con un tamaño de partícula inferior a las 75 micras.

El lote de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles con el que se preparó el chocolate enriquecido, presentaba un color púrpura característico con un contenido de humedad del 5%, un contenido graso del 11%, pH 6,5, un tamaño de partícula 99% inferior a las 75 micras y un contenido de (poli)fenoles totales superior a los 10 g/100g de producto, tal y como constaba en las especificaciones técnicas del ingrediente.

7.2.1.2. Polvo de cacao convencional (natural no alcalinizado).

El polvo de cacao convencional comercial con el que se preparó el chocolate estándar, fue un polvo de cacao natural no alcalinizado, color castaño claro, con un contenido graso del 11%, pH 5,6, contenido en humedad del 5% y una finura del polvo de un 99% inferior a las 75 micras como constaba en las especificaciones del producto.

A diferencia del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, el polvo de cacao convencional representaba a un polvo desgrasado obtenido a partir de semillas de cacao fermentadas y secadas en el país de origen, descascarilladas, tostadas, desgrasadas por prensado hidráulico hasta un contenido en grasa del 10-12%.

7.2.1.3. Pasta de Cacao.

La pasta de cacao comercial con la que se prepararon los dos tipos de chocolate (negro enriquecido y negro no enriquecido), era una pasta de cacao natural (no alcalinizada), de color marrón oscuro típico, con un contenido graso del 54%, tamaño de partícula del 99% inferior a las 75 micras, pH 5,6 y contenido en humedad del 2%, como constaba en las especificaciones técnicas de producto.

7.2.1.4. Preparación del chocolate negro enriquecido con el ingrediente de cacao rico en procianidinas, y chocolate negro no enriquecido (o chocolate estándar).

La elaboración de los dos tipos de chocolate, chocolate negro enriquecido en procianidinas y chocolate negro no enriquecido o chocolate estándar, se realizó a nivel piloto fabricándose 4 kilos de chocolate de cada tipo. Para ello se mezclaron los ingredientes básicos requeridos en cada formulación (pasta de cacao, azúcar, manteca de cacao, lecitina y vainillina) añadiendo un 15% de ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles en el caso del chocolate enriquecido, y un 15% de polvo de cacao convencional natural no alcalinizado (cacao comercial en polvo) en el caso del chocolate estándar.

La proporción de ingredientes empleados para la formulación de cada chocolate negro se muestra en la **Tabla 7.1**

Tabla 7.1. Ingredientes empleados en la formulación del chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles o no enriquecido.

INGREDIENTE (g/100 g)	Chocolate negro con ingrediente rico en (poli)fenoles	Chocolate negro no enriquecido (chocolate estándar)
Pasta de cacao	58	58
Azúcar	20,5	20,5
Manteca de cacao	6	6
Ingrediente cacao rico en (poli)fenoles	15	-
Polvo de cacao natural no alcalinizado	-	15
Vainillina	0,05	0,05
Lecitina	0,45	0,45

7.2.2. Determinación de flavanoles por HPLC con fase reversa y detección por ultravioleta (HPLC-DAD).

7.2.2.1. Preparación de las muestras.

Las muestras que contenían más de un 12% de grasa fueron previamente desgrasadas antes de su análisis. La eliminación de la fracción lipídica en las muestras de pasta de cacao y chocolate se realizó por el método Soxhlet empleando como disolvente éter de petróleo. Previo a la extracción de la grasa, las muestras de pasta de cacao y chocolate fueron fundidas a 40 ºC y homogenizadas mediante agitación, dejándolas enfriar a continuación. Una vez desgrasadas, las muestras fueron molidas empleando un molinillo de café.

7.2.2.2. Análisis de flavanoles.

La extracción y separación cromatográfica de (-)-epicatequina, (+)-catequina, procianidina B1 y procianidina B2 en fase reversa en las muestras

de pasta de cacao y chocolate desgrasadas así como en el polvo de cacao convencional y en el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles) y su cuantificación con detector de ultravioleta, se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el **Capítulo 4**.

7.2.3. Determinación de procianidinas (monómeros a decámeros y polímeros) por HPLC en fase normal y detección por fluorescencia (HPLC-FL).

7.2.3.1. Preparación de las muestras.

El desgrasado de las muestras se realizó de acuerdo al método descrito por Gu *et al.* (2006). Para ello, se pesaron 2 gramos de muestra de polvo de cacao, pasta de cacao y chocolate. Se añadieron 45 ml de n-hexano, se agitó hasta que todos los sólidos quedaron dispersos y se centrifugó a 3000 *g* durante 5 minutos a 4 ºC obteniéndose el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces más, añadiendo 45 ml de n-hexano al residuo. Finalmente, se unieron los sobrenadantes obtenidos y se dejaron bajo una campana de extracción para la evaporación del n-hexano.

7.2.3.2. Extracción de procianidinas.

La extracción de procianidinas se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Gu *et al.* (2002). A la muestra desgrasada, se añadieron 2 perlas de vidrio de 3 mm y 15 ml de una solución de extracción acetona/agua/ácido acético en proporciones 70/29,5/0,5 (v/v/v). La mezcla se agitó vigorosamente y se colocó el tubo en un baño de ultrasonidos a 37 ºC durante 15 minutos, agitando a continuación durante 10 minutos más. Posteriormente se centrifugó a 3000 *g* durante 5 minutos a 4 ºC. Se repitió el proceso de extracción dos veces más añadiendo 15 ml de la solución de

extracción al residuo. Finalmente, los sobrenadantes obtenidos en cada etapa de extracción se unieron en un matraz y se evaporó la acetona a 40 ºC hasta un volumen de 10 ml empleando un rotavapor a vacío. Tras la eliminación de la acetona, la solución remanente se agitó en un baño de ultrasonidos durante 60 segundos añadiendo un poco de agua para arrastrar las partículas que quedaron pegadas a las paredes del matraz. Este extracto obtenido se purificó empleando una unidad de extracción en fase sólida (SPE) equipada con vacío (modelo Visiprep). Como fase sólida se utilizó un relleno lipofilico de Sephadex LH20 (Scharlab, España).

El Sephadex LH-20 se acondicionó con agua la noche anterior a 4 ºC y se procedió a colocarlo en los tubos de extracción. Para cada muestra, se acondicionaron 3 gramos de Sephadex LH-20 en 15 mL de agua. A continuación, se dejó pasar la muestra a una velocidad de 1 gota por segundo controlando el caudal con la válvula de vacío. Una vez retenidas las procianidinas en el adsorbente, se lavó la columna con una mezcla de metanol/agua en proporciones 30/70 (v/v) para eluir los azúcares y fenoles. A continuación se eluyeron las procianidinas con 80 ml de una mezcla de acetona/agua en proporción 70/30 (v/v) hasta que la columna quedó totalmente limpia. Finalmente, se evaporó la acetona a 45 ºC empleando un rotavapor a vacío dejando las procianidinas disueltas en medio acuoso. El extracto acuoso obtenido fue liofilizado y disuelto en 10 ml de la mezcla extractiva acetona/agua/ácido acético 70/29,5/0,5 (v/v/v). Finalmente, la muestra se filtró con un filtro PTFE de 0,45 µm y se inyectó en el equipo HPLC para su análisis en fase normal y detector de fluorescencia.

7.2.3.3. Cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia.

Para la separación cromatográfica y cuantificación de las diferentes fracciones de procianidinas según su grado de polimerización, se inyectaron 20 µl del extracto purificado en un HPLC Agilent 1100 equipado con un degasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un compartimento de columna termostatizado (Agilent Technologies, EE.UU).

Se empleó una columna C8 de fase normal Luna Silica 100 Å (Phenomenex, España) de dimensiones 150 mm x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil empleada fue una mezcla de diclorometano (A), metanol (B), y ácido acético glacial con agua (C) en proporciones 50/50 (v/v) y de calidad HPLC. El gradiente fue el siguiente: 0-30 min, 14-28,4% lineal de B; 30-45 min, 28,4-39,6% lineal de B; 45-50 min, 39,6-86% lineal de B, 50-55 min, 86% B isocrático, 55-60 min, 86-14% lineal de B, 60-70 min, se vuelve a las condiciones iniciales. Un 4% de C se mantuvo constante todo el gradiente. El flujo establecido fue de 0,5 ml/min. La detección se llevó a cabo empleando un detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 276 nm y de emisión de 316 nm.

La integración de las diferentes fracciones de procianidas (desde monómeros hasta decameros y polímeros) fue manual y su cuantificación se realizó empleando factores de respuesta publicados previamente obtenidos experimentalmente para cada fracción.

La **Tabla 7.2.** muestra los valores de los factores de respuesta relativos a la (-)-epicatequina (área/µg) empleados para cada procianidina en función de su grado de polimerización (Prior & Gu, 2005). Para calcular la concentración de cada fracción de procianidina (mg/g) se aplicó la siguiente ecuación:

$$F_{i/EC} = f_i / f_{EC}$$

Donde $F_{i/EC}$ es el factor de respuesta de cada fracción de procianidina relativo a la (-)-epicatequina (EC), fi es el factor de respuesta de cada fracción de procianidina (area/µg) y f_{EC} es el factor de respuesta de la (-)-epicatequina (area/µg).

Tabla 7.2. Factores de respuesta relativos de monómeros a decámeros incluidos los polímeros con detector de fluorescencia (Prior & Gu, 2005)

Grado de polimerización	Factor de respuesta relativo[a] (Área/µg)
Monómero	1
Dímero	0,65
Trímero	0,69
Tetrámero	0,61
Pentámero	0,58
Hexámero	0,45
Heptámero	0,62
Octámero	0,52
Nonámero	0,36
Decámero	0,56
Polímero	0,45

[a]Factor de respuesta relativo a la (-)-epicatequina.

7.2.4. Capacidad antioxidante por el método ORAC.

La medida de la capacidad antioxidante del chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles y del chocolate estándar se realizó por el método ORAC (Cao *et al*., 1993). El valor de ORAC fue expresado como micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de sustancia. Esta medida fue realizada en un laboratorio externo (Brunswick, USA).

7.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Para el estudio de flavanoles ((+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1 y B2) y fracciones de procianidinas (desde monómeros a decámeros incluídos los polímeros) en los diferentes productos derivados de cacao, los métodos cromatográficos de HPLC acoplados a un detector de diodos (DAD) con columna en fase reversa y los acoplados a un detector de fluorescencia con columna en fase normal, respectivamente, proporcionaron métodos muy útiles para la caracterización de los compuestos (poli)fenólicos. Los métodos permitieron la separación y cuantificación al mismo tiempo de los flavanoles (-)-epicatequina, (+)-catequina, procianidina B1 y B2 así como la separación de las distintas fracciones de procianidinas según su grado de polimerización.

Para la cuantificación de los monómeros (+)-catequina, (-)-epicatequina y los dímeros de procianidina B1 y procianidina B2 se empleó un detector de diodos acoplado a un HPLC equipado con columna de fase reversa. La **Figura 7.1.** muestra un cromatograma típico a 280 nm del chocolate negro formulado con el ingrediente rico en (poli)fenoles. El método ha permitido en todos los casos la separación y cuantificación de la (-)-epicatequina, (+)-catequina, procianidina B1 y B2 en un tiempo de 16 minutos. Los picos a un tiempo de retención de 2 minutos y 9 minutos correspondían a la teobromina y cafeína respectivamente.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de todos los ingredientes base cacao y los tres tipos de chocolate negro, se muestran en la **Tabla 7.3.** Como se puede observar, los flavanoles mayoritarios fueron la (-)-epicatequina y la procianidina B2. Así, considerando el total de los flavanoles cuantificados, la (-)- epicatequina representó entorno al 54% del total, tanto en el polvo de cacao convencional como en el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles; suponiendo un 47% del total en el caso de la pasta de cacao. Sin embargo, la procianidina B2, fue el compuesto mayoritario y representó

el 42% del total en el caso del chocolate rico en (poli)fenoles y el 34% del total en el chocolate estándar.

En resumen, la abundancia de los flavanoles cuantificados en los derivados de cacao ha seguido el siguiente orden:

- Ingrediente de cacao, polvo de cacao convencional y pasta de cacao:

  (-)-epicatequina>procianidina B2>(+)-catequina>procianidina B1.

- Chocolate negro con el ingrediente rico en (poli)fenoles:

  procianidina B2>(-)-epicatequina>procianidina B1>(+)-catequina.

- Chocolate estándar:

  procianidina B2>procianidina B1>(-)-epicatequina>(+)-catequina

La suma total de flavanoles del chocolate rico en (poli)fenoles fue 2,5 veces superior a la del chocolate estándar, con lo que se ha conseguido incrementar más del doble la cantidad del flavanoles y hasta tres veces el contenido de (-)-epicatequina respecto al chocolate estándar.

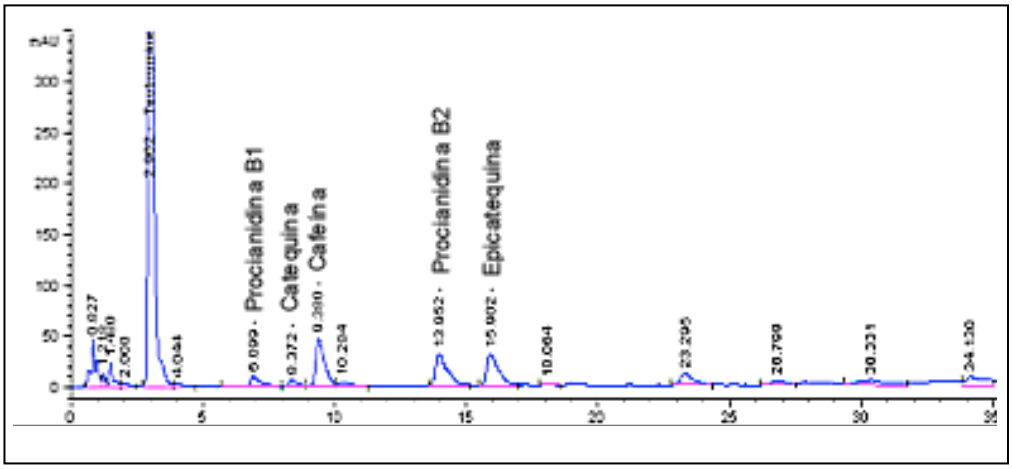


Figura 7.1.

Cromatograma HPLC-DAD (λ=280 nm) del chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles.

Tabla 7.3. Contenido de flavanoles (mg/g muestra p.s.) en el ingrediente rico en (poli)fenoles, polvo de cacao convencional, pasta de cacao, chocolate negro enriquecido y chocolate estándar.

Flavanoles	Ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles	Polvo de cacao convencional	Pasta de Cacao	Chocolate negro con ingrediente rico en (poli)fenoles	Chocolate negro no enriquecido (chocolate estándar)
(-)-Epicatequina	24,9 (0,0)	1,9 (0,5)	1,7 (0,2)	3,4 (0,2)	1,1 (0,1)
(+)-Catequina	3,4 (0,0)	0,51(0,06)	0,36 (0,06)	0,55 (0,00)	0,26 (0,04)
Procianidina B2	14,2 (0,3)	1,0 (0,2)	1,3 (0,0)	4,2 (0,1)	1,3 (0,2)
Procianidina B1	2,1 (0,1)	0,08 (0,0)	0,27 (0,03)	1,8 (0,1)	1,2 (0,1)
Total flavanoles	**44,6 (0,3)**	**3,5 (0,8)**	**3,6 (0,1)**	**9,9 (0,1)**	**3,8 (0,1)**

Resultados de flavanoles son la media de tres repeticiones (n=3) y entre paréntesis la desviación estándar.

Para la cuantificación de las procianidinas oligoméricas en función de su grado de polimerización, desde las unidades monoméricas hasta los decámeros, y polimeros, se empleó un detector de fluorescencia acoplado a un HPLC con columna de fase normal. Debido a la ausencia de patrones puros de las diferentes fracciones de procianidinas, la cuantificación de las mismas se realizó empleando factores de respuesta relativos publicados previamente en chocolate (Prior & Gu, 2005). Las **Figuras 7.2.** y **7.3.** muestran los cromatogramas obtenidos en el chocolate negro rico en (poli)fenoles y en el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, respectivamente. El método utilizado ha permitido en todos los casos la separación de las fracciones de procianidinas hasta las diez unidades (decámeros), siendo las procianidinas de grado de polimerización mayor, cuantificadas como un único pico al final del cromatograma y a un tiempo de retención de 52 minutos.

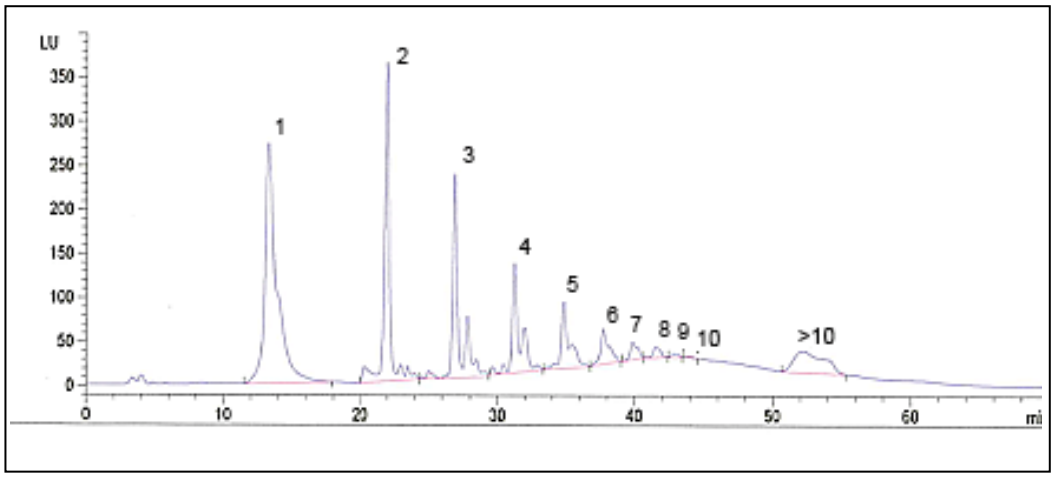


Figura 7.2.

Cromatograma de HPLC del extracto de chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles utilizando un detector de fluorescencia y fase normal. Los números hacen referencia al grado de polimerización; 1: monómeros; 2: dímeros; 3: trímeros; 4: tetrámeros; 5: pentámeros; 6: hexámeros; 7: heptámeros; 8: octámeros; 9: nonámeros; >10: procianidinas con grado de polimerización superior a 10 unidades.

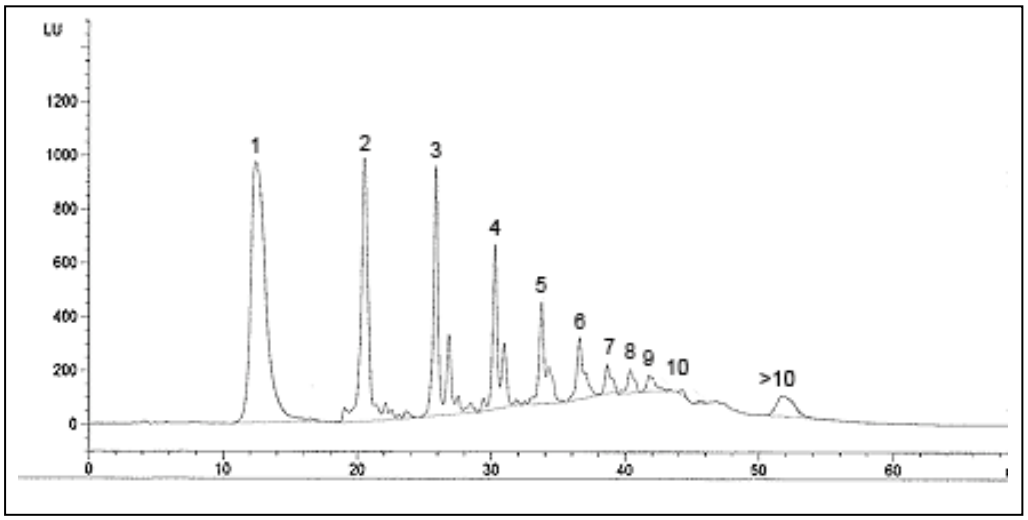


Figura 7.3.

Cromatograma de HPLC del extracto de ingrediente rico en (poli)fenoles utilizando un detector de fluorescencia y fase normal. Los números hacen referencia al grado de polimerización, 1: monómeros; 2: dímeros; 3: trímeros; 4: tetrámeros; 5: pentámeros; 6: hexámeros; 7: heptámeros; 8: octámeros; 9: nonámeros; >10: procianidinas con grado de polimerización superior a 10 unidades.

La **Tabla 7.4.** muestra la distribución de procianidinas en los ingredientes base de cacao (ingrediente rico en (poli)fenoles, polvo de cacao convencional y pasta de cacao) así como en los dos chocolates elaborados. En el caso del ingrediente rico en (poli)fenoles y en el caso del chocolate rico en (poli)fenoles, la fracción mayoritaria fue la de los monómeros representando un 23% respecto del total de las procianidinas cuantificadas. Sin embargo, en el caso de la pasta, polvo de cacao convencional y chocolate estándar, la fracción mayoritaria fue la de los polímeros (>decámeros), suponiendo estas fracciones unos porcentajes del 35%, 37% y 22%, respectivamente. Teniendo en cuenta que las propiedades saludables atribuidas al cacao están relacionadas con elevadas cantidades de monómeros y dímeros más biodisponibles (Cooper *et al.*, 2008), el ingrediente y el chocolate desarrollado rico en procianidinas, podría tener una mayor repercusión en los beneficios sobre la salud.

Gu *et al*. (2006) empleando un método similar de extracción y purificación con Sephadex LH20 y análisis en fase normal empleando un HPLC-ESI/MS con detector de fluorescencia, publicaron en muestras de chocolate negro valores de procianidinas totales desde 8,5 a 20 mg/g; valores que son muy similares a los 15 mg/g encontrados en el chocolate estándar y a los 21 mg/g del chocolate rico en (poli)fenoles. Sin embargo, el chocolate enriquecido en (poli)fenoles desarrollado en nuestro estudio se ha caracterizado por tener además valores más altos de procianidinas de bajo peso molecular que los valores publicados. Siendo la suma de monómeros hasta hexámeros encontrado en el chocolate rico en (poli)fenoles de 17 mg/g frente a los 10 mg/g (monomeros a hexámeros) publicado por Gu *et. al.* (2006) en un chocolate negro y los 11 mg/g encontrados en este trabajo para el chocolate estándar.

Asimismo, los valores de procianidinas totales de 13 mg/g en muestras de pasta de cacao y 21 mg/g en polvo de cacao publicados por Miller *et al.* (2009) son próximos a los encontrados en este trabajo para la pasta de cacao (11 mg/g) y polvo de cacao convencional (17 mg/g).

Tabla 7.4. Contenido procianidinas (mg/g) de los ingredientes base cacao y chocolates elaborados.

Muestra	Procianidinas (mg/g)											
	monómeros	dímeros	trímeros	tetrámeros	pentámeros	hexameros	heptámeros	octámeros	nonámeros	decámeros	polímeros	TOTAL
Ingrediente cacao rico en (poli)fenoles	17,7 (0,1)	16,7 (1,4)	13,0 (0,9)	10,9 (0,0)	7,0 (0,0)	5,0 (0,4)	1,7 (0,3)	0,9 (0,1)	0,47 (0,02)	0,07 (0,11)	4,57 (0,2)	**78,0 (1,5)**
Polvo de cacao convencional	2,7 (0,2)	3,0 (0,2)	2,0 (0,2)	1,3 (0,0)	0,77 (0,03)	0,51 (0,0)	0,13 (0,02)	0,12 (0,02)	0,04 (0,01)	nd	6,2 (0,9)	**16,7 (1,6)**
Pasta de cacao	1,7	1,9	1,1	0,89	0,51	0,41	0,15	0,15	0,07	0,09	3,9	**10,9**
Chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles	4,7 (0,1)	4,2 (0,3)	3,2 (0,2)	2,3 (0,1)	1,5 (0,0)	1,0 (0,0)	0,3 (0,03)	0,2 (0,04)	0,14 (0,02)	0,02 (0,01)	3,2 (1,1)	**20,8 (0,9)**
Chocolate estándar	3,2 (0,0)	2,9 (0,2)	2,0 (0,0)	1,5 (0,0)	0,97 (0,0)	0,66 (0,0)	0,20 (0,01)	0,15 (0,01)	0,08 (0,02)	nd	3,3 (0,3)	**15,0 (0,5)**

Resultados son la media de dos repeticiones (n=2), excepto en la pasta de cacao donde n=1, entre paréntesis la desviación estándar; nd: no se detecta

Se analizó la capacidad antioxidante del chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles y del chocolate negro convencional mediante el método ORAC. El valor en el chocolate negro elaborado con el ingrediente rico en (poli)fenoles fue de 641 µmol de equivalentes de Trolox por gramo de chocolate y el valor en el chocolate negro no enriquecido o chocolate estándar fue de 412 µmol de equivalentes de Trolox por gramo de chocolate. Es decir, la capacidad antioxidante del chocolate negro enriquecido en (poli)fenoles fue un 60% superior que la capacidad antioxidante del chocolate negro estándar o chocolate no enriquecido.

Así, los valores de capacidad antioxidante encontrado en ambos tipos de chocolate, son significativamente más altos a los correspondientes valores encontrados en muestras de zumos de frutas de acai, arándano y granada, bebida natural de cacao y mezcla instantánea de cacao (Crozier *et al*., 2011).

7.4. CONCLUSIONES

Se ha logrado la formulación de un chocolate rico en (poli)fenoles con unos contenidos de (+)-epicatequina y procianidina B2 de 200 y 250 mg por ración (60 gramos de chocolate) respectivamente, así como un notable enriquecimiento de las fracciones de procianidinas oligoméricas (desde monómeros a hexámeros), cuando se compararon con otros valores publicados en chocolate negro empleando el mismo método (Miller *et al*. 2009; Gu *et al*. 2006).

Así mismo, la formulación del chocolate negro empleando un 15% del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles, ha conseguido aumentar la capacidad antioxidante un 60% respecto a un chocolate formulado con un 15% de un polvo de cacao convencional.

Por lo tanto, es de destacar que el diseño de este nuevo chocolate enriquecido en compuestos bioactivos más biodisponibles, que puedan aportar al consumidor posibles beneficios añadidos para la salud, podría tener un interés actual tanto para las grandes compañías de alimentos como para los profesionales de la salud. Se abre así con este ingrediente, caracterizado tanto desde el punto de vista tecnológico como analítico, nuevas líneas de investigación encaminadas a la búsqueda de una posible funcionalidad tanto del ingrediente como de su aplicación final.

CAPÍTULO 8

Conclusiones Generales

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados expuestos en los capítulos anteriores, la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las conclusiones generales que se presentan a continuación:

Primera: El contenido de (poli)fenoles en los granos de cacao varía en función del tipo de cacao, observando variaciones en los contenidos de estos compuestos entre las muestras analizadas, siendo el genotipo identificado como el clon CCN51, de la variedad de cacao Amazónico y originario de Ecuador, el que mostró un mayor contenido de (poli)fenoles en las semillas de cacao.

Segunda: La fermentación y tostado del grano de cacao reducen el contenido de (poli)fenoles totales, asociado a la oxidación de estos compuestos por acción de la enzima PPO y por acción de las altas temperaturas.

Tercera: La aplicación de un tratamiento térmico de escaldado con agua a 95 ºC durante 5 minutos al grano fresco de cacao, permite la inactivación de la enzima PPO, reduciendo las pérdidas por oxidación de (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B2, al compararlas con los de un grano secado no fermentado. Por ello, los “nibs” de cacao de semillas no fermentadas y con la enzima PPO inactivada, constituye una materia prima de interés para la obtención del ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles.

Cuarta: El prototipo óptimo de cacao en polvo desgrasado por Soxhlet a partir de semillas con la enzima PPO inactivada, puso de manifiesto que el proceso de desgrasado no afecta al contenido de (poli)fenoles.

Quinta: El prototipo piloto de cacao desgrasado con CO_2 supercrítico, ha mostrado que se preserva el contenido de los (poli)fenoles totales,

flavanoles y la capacidad antioxidante, en comparación con los de un polvo de cacao convencional. Sin embargo, la tecnología de desgrasado empleando CO_2 no se considera adecuado para su aplicación industrial, ya que encarecería los costes de producción aumentando el valor económico del producto final.

Sexta: La aplicación de un tratamiento térmico con calor húmedo a 121 ºC durante 1 minuto al cacao desgrasado, permite producir un ingrediente de cacao comercialmente estéril y con un alto contenido en (poli)fenoles, mostrando un mejor perfil cuantitativo de flavanoles, en comparación con el polvo de cacao producido por el proceso convencional.

Séptima: Dentro del contenido total de procianidinas oligoméricas (desde monómeros a decámeros) del ingrediente de cacao rico en polifenoles, destacaron las fracciones de monómeros y dímeros, representando estas fracciones un 30% respecto al total de prociandinas, contenido superior al descrito en la bibliografía científica para el cacao convencional.

Octava: En las muestras de ingrediente de cacao desgrasado rico en (poli)fenoles hay una buena aproximación entre la cuantificación de los (poli)fenoles totales, según el método de Folin-Ciocalteu, y el contenido de procianidinas totales cuantificadas por HPLC-MS. Este hecho es de gran interés para la industria del cacao ya que nos demuestra que el método de Folin-Ciocalteau permite cuantificar de forma rápida los compuestos (poli)fenólicos totales, y nos sirve para realizar una estimación del contenido de procianidinas totales.

Novena: El desarrollo de un chocolate negro formulado con el ingrediente rico en (poli)fenoles, incrementó los contenidos de (-)-epicatequina y procianidina B2, presentando mayoritariamente las formas oligoméricas

de monómeros y dímeros, compuestos que se han descrito que son más biodisponibles.

Décima: La capacidad antioxidante del chocolate negro formulado con el ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles fue un 60% más alta que la capacidad antioxidante de un chocolate formulado con un polvo de cacao convencional. Aunque no hemos evaluado la funcionalidad del chocolate, la mayor capacidad antioxidante junto con el mayor contenido de flavanoles, nos indica que este producto podría presentar un mayor efecto beneficioso para la salud.

CAPÍTULO 9

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Afoakwa E.O., Quao J., Budu A.S., Takrama J.F., Saalia F.K. (2012). Changes in total polyphenols, *o*-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa *(Theobroma cacao)* beans. *International Food Research Journal*, 19: 1071–1077.

Afoakwa E.O., Ofosu-Ansah E., Budu A.S., Mensah-Brown H., Takrama J.F. (2015). Roasting effects on phenolic content and freeradical scavenging activities of pulp preconditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 15: 9635-9650.

Aggett P.J., Antoine J.M., Asp N.G., Bellisle F., Contor L., Cummings J. H., Howlett J., Müller D. J. G., Persin C., Pijls L. T. J., Rechkemmer G., Tuijtelaars S., Verhagen H. (2005). Passclaim. Proccess for the assesment of scientific support for claims on foods. Consensus on criteria. *European Journal of Nutrition*, 44: I/2-I/30.

Aikpokpodion P.E., Dongo L.N. (2010). Effects of fermentation intensity on polyphenols and antioxidant capacity of cocoa beans. *International Journal of Sustainable Crop Production,* 5: 66-70.

Andrés-Lacueva C., Lamuela-Raventós R.M., Jáuregui O., Casals I., Izquierdo-Pulido M., Permayer J. (2000). An LC method for the analysis of cocoa phenolics. *LC: GC Europe,* 902-904.

Andres-Lacueva C., Monagas M., Khan N., Izquierdo-Pulido M., Urpi-Sarda M., Permanyer J., Lamuela-Raventós R.M. (2008). Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: Influence of the manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 56: 3111-3117.

Andújar M., Recio M.C., Giner R.M., Ríos J.L. (2012). Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-23.

Anónimo (1991). Centro de Comercio Internacional UNCTAD/GATT. Cacao fino o de aroma. Estudio de la producción y el comercio mundial. Ginebra.

Anónimo (1999). Functional foods-Position of ADA**.** *Journal of the American Dietetic Association*, 99:1278-1285.

Anónimo (2009). *EFSA Journal*, 7: 1300.

Anónimo (2011a). *EFSA Journal*, 9: 2269.

Anónimo (2011b). *EFSA Journal*, 9: 2082.

Baba S., Osakabe N., Kato Y., Natsume M., Yasuda A., Kido T., Fukuda K., Muto Y., Kondo K. (2007). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *American Journal Clinical Nutrition*, 85:709–17.

Belitz H.D., Grosch W. (1992). Cacao y Chocolate. Química de los Alimentos. Segunda Edición, Ed. ACRIBIA S.A., España. 1035-1046.

Bordiga M., Locatelli M., Travaglia F., Coisson J.D., Mazza G., Arlorio M. (2015). Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate. *International Journal of Food Science and Technology,* 50: 840-848.

Bradbury A.G.W., Kschonek E.M. (2008). Cocoa beans with reduce polyphenol oxidase activity and high polyphenol content. *EP2005835 (A1)*, Kraft Foods R&D Inc, US.

Caligiani A., Cirlini M., Palla G., Ravaglia R., Arlorio M. (2007). GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality*, 19: 329-334.

Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14: 301-311.

Cartay R. (1999). El cacao venezolano en el mercado mundial: situación actual y perspectivas. Informe nº5, proyecto CONICIT Nº 96001339, Agenda Cacao.

Cooper K.A., Donovan J.L., Waterhouse A.L., Williamson G. (2008). Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99: 1-11.

Cros E., Villeneuve F., Vincent J.C. (1982). Search for a fermentation index of cacao; development of total bean tannins and phenols. *Café Cacao Thé*, 16: 109-114.

Crozier S.J., Preston A.G., Hurst J.W., Payne M.J., Mann J., Hainly L., Miller D. (2011). Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central Journal*, 5:1-6.

de Brito E.S., Garcia N.H.P., Gallao M.I., Cortelazzo A.L., Fevereiro P.S., Braga M.R. (2000). Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation, drying and roasting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 281-288.

de Brito E.S., García N.H.P., Amancio A.C. (2002). Effect of polyphenol oxidase (PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. *Ciência e Tecnologia de Alimentos,* 22: 45-48.

Delonga K., Jolic´ M.S., Redovnikovic R.I., Markovic´ K., D. S.ˇ ipusˇic´. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 1793–1800.

Dillinger T.L., Barriga P., Escarcega S., Jimenez M., Lowe D.S.,, Grivetti L.E. (2000). Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *Journal of Nutrition*, 130:2057S-72S.

Di Mattia C., Martuscell M., Sacchetti G., Scheirlinck I., Beheydt B., Mastrocola D., Pittia P. (2013). Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 3420–3432.

Di Mattia C., Martuscelli M., Sacchetti G., Beheydt B., Mastrocola D., Pittia P. (2014). Effect of different conching processes on procyanidin content and antioxidant properties of chocolate. *Food Research International*, 63: 367–372.

Engler M.B. (2004).The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *US Cardiology*, 1-7.

Erdman J.W., Balentine D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Hamly J., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J. (2007). Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005. Washington, DC. *The Journal of Nutrition,* 137: 718S-737S.

Escribano M.T., Santos-Buelga C. (2003). Polyphenol extraction from foods. En: Methods in polyphenol analysis. Ed. Royal Society of Chemistry, Reino Unido. 1-16

Fernández-Murga L., Tarín J.J., García-Perez M.A., Cano A. (2011). The impact of chocolate on cardiovascular health. *Maturitas*, 69: 312– 321.

Fraga C.G., Actis-Goretta L., Ottaviani J.I., Carrasquedo F., Lotito S.B., Lazarus S., Schmitz H.H., Keen C.L. (2005). Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clinical & Developmental Immunology*, 12: 11-17.

Gómez-Juaristi M., González-Torres L., Bravo L., Vaquero M.P., Bastida S., Sanchez-Muñiz F.J. (2011). Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 26: 289-292.

Grassi D., Necozione S., Lippi C., Croce G., Valeri L., Pasqualetti P., Desideri G., Blumberg J.B., Ferri C. (2005). Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension*, 46:398–405.

Grassi D., Desideri G., Ferri C. (2010). Blood pressure and cardiovascular risk: what about cocoa and chocolate? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501:112–115.

Gu L.; Kelm M., Hammerstone J. F., Beecher G., Cunningham D., Vannozzi S.,, Prior R. L. (2002). Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4852-4860.

Gu L., House S.E., Wu X., Ou B.,, Prior R.L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54:4057-61.

Güzel-Seydim Z., Bever Jr.P.I., Greene A.K. (2004). Efficacy of ozone to reduce bacterial population in the presence of food components. *Food microbiology*, 21: 474-479.

Harwood M.L., Ziegler G.R., Hayes J.E. (2013). Tolerance for high flavanol cocoa powder in semisweet chocolate. *Nutrients*, 5: 2258–2267.

Hii C.L., Law C.L., Suzannah S., Misnawi, Cloke M. (2009a). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-industry,* 2: 702-722.

Hii C.L., Law C.L., Cloke M., Suzannah S. (2009b). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering*, 102: 153-161.

Holm F. (2003). New Functional Food Ingredients Cardiovascular Health. Fair flow 4 synthesis report. SMEs nº.5. Ed. INRA, Francia. 40.

Holt R.R., Lazarus S.A., Sullards M.C., Zhu Q.Y., Schramm D.D., Hammerstone J.F., Fraga C.G., Schmitz H.H., Keen C.L. (2002a). Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *American Journal Clinical Nutrition*, 76:798-804.

Holt R.R., Schramm D.D., Keen C.L., Lazarus S.A., Schmitz H.H. (2002b). Chocolate consumption and platelet function. *Jama*, 287:2212-2213.

Hooper L., Colin K., Andelhamid A., Kroon P.A., Cohn J.S., Rimm E.B., Cassidy A. (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95: 740-51.

Juárez Iglesias M. (2010). Presente y futuro de los alimentos funcionales. En: Alimentos saludables y de diseño específico. Ed. IM&C, España. 29-44.

Jumnongpon J., Chaiseri S., Hongsprabhas P., Healy J.P., Meade S.J., Gerrard J.A. (2012). Cocoa protein crosslinking using Maillard chemistry. *Food Chemistry*, 134: 375-380.

Kattenberg H. R., Willemsen J. H. A. (2003). The manufacture of cocoa polyphenols as healthy supplements in food products. IFIS Journal. Food Science, <http://www.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/12553>.

Kealey K.S., Snider R.M., Romanczyk L.J., Hammerstone J.F., Buck M.M., Cipolla G.G. (1996). Method for producing fat and/or solids from cocoa beans. United States Patent *6,015,913*, Mars Incorporated, USA.

Kealey K.S., Snyder R.M., Romanczyk L.J., Geyer H.M., Myers M.E., Withcare E.J., Hammerstone J.F., Schmitz H.H. (1998). Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses. United States Patent *6,312,753*, Mars Incorporated, USA.

Kelm M.A., Johnson C., Robbins R.J., Hammerstone J.F., Schmitz H.H. (2006). High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1571-1576.

Khan N., Monagas M., Andres-Lacueva C., Casas R., Urpi-Sarda M., Lamuela-Raventos R.M., Estruch R. (2012). Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22: 1046–1053.

Khan N., Khymenets O., Urpí-Sardà M., Tulipani S., Garcia-Aloy M., Monagas M., Mora-Cubillos X., Llorach R., Andres-Lacueva C. (2014). Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, 6: 844-880.

Kim H., Keeney P.G. (1984). (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science*, 49: 1090-1092.

Kowalska J., Sidorczuk A. (2007). Analysis of the effect of technological processing on changes in antioxidant properties of cocoa processed products. *Polish Journal of Food and Nutrition Science,* 57: 95-99.

Kyi T.M., Wan Dau W.R., Mohammad A.B., Samsudin M.W., Kadhum A.A.H., Meor Talib M.Z. (2005). The kinetics of polyphenol degradation during the drying of

Malaysian cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 323-331.

Lamuela-Raventós R. M., Romero-Pérez A. I., Andrés-Lacueva C., Tornero A. (2005). Review: Health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International,* 11: 159–176.

Latham L.S., Hensen Z.K., Minor D.S. (2014). Chocolate- Guilty pleasure or healthy supplement. *Journal of Clinical Hypertension*, 16: 101-106.

Lee S-Y., Yoo S-S., Lee M-J., Kwon I-B., Pyun Y-R. (2001). Optimization of Nibs Roasting in Cocoa Bean Processing with Lotte-Better Taste and Color Process. *Food Science and Biotechnology*, 10: 286-293.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J., Lee C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7292-7295.

Li S., Hartland S. (1992). Influence of co-solvents on solubility and selectivity in extraction of xanthines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical CO_2. *Journal of Supercritical Fluids*, 5: 7-12.

Liendo R.J. (2005). Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos. *INIA Divulga*, 1-4.

Lima E. D. P. de .A., Pastore G. M., Fernandez Barbery S. D., Garcia N. H. P., de Brito E.S.,, Lima C.A. de A. (2001). Obtaining and use of polyphenoloxidase enzyme extracted from ripe custard apple (*annona squamosa l.*) pulp on the cocoa (*theobroma cacao L.*) nibs in taste improvement. *Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal*, 23: 709-713.

Loffredo L., Perri L., Catasca E., Pignatelli P., Brancorsini M., Nocella C. De Falco E., Bartimoccia S., Frati G., Carnevale R., Violi F. (2014). Dark Chocolate acutely improves walking autonomy in patients with peripheral artery disease. *Journal of the American Heart Association*, 3: 1-9.

Ludwig C.J., Windsor N.L., Anilkumar Ganapati G., Kim N-C., Matusheski N.V., West L.G., Fontes M.C de A., Zeller B.L., Vellucci D.J., Kijowski M., Kopp G.M. (2008). Reduction of Astringency in polyphenol composition. Patent

Cooperation Treaty (PCT) *WO2008/083152A2*, Kraft Foods Holdings, Inc., US.

Lutz M. (2009). Alimentos funcionales en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles. Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación. Universidad de Valparaíso, Chile. 37-50.

Marshall M. R., Kim J., Wei C. (2000). Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods. FAO: Roma, Italia.

Martín M.A., Goya L., Ramos S. (2013). Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cáncer. *Food and Chemical Toxicology*, 56: 336-351.

Mazor Jolic S., Radojcic Redovnikovic I., Markovic K., Ivanec Sipusic D., Delonga K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 1793–1800.

Miller K.B., Stuart D.A., Smith N.L., Lee C.Y., Mc Hale N.L., Flanagan J.A., Ou B., Hurst W.J. (2006). Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4062-8.

Miller K.B., Hurst W.J., Payne M.J., Stuart D.A., Apgar J., Sweigart D.S., Ou,B. (2008). Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 8527-8533.

Miller K.B. Hurst W.J., Flannigan N., Ou B., Lee C.Y., Smith N., Stuart D. (2009). Survey of commercially available chocolate-and cocoa-containing products in the United States. 2. Comparison of flavan-3-ol content with nonfat cocoa solids, total polyphenols, and percent cacao. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9169-9180.

Misnawi., Jinap S., Jamilah B., Nazamid S. (2003). Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans. *International Journal of Food Science and Technology,* 38: 285–295.

Misnawi., Jinap S., Jamilah B.,, Nazamid S. (2004). Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry*, 85: 73–80.

Monagas M., Urpi-Sarda M., Sanchez-Patan F., Llorach R., Garrido I., Gomez-Cordoves C., Andres-Lacueva C., Bartolome B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1: 233–253.

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

Niemank N., Rohsius C., Elwers S., Omokolo D., Lieberei R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao L.*) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 612-9.

Ortega N**.,** Romero M.P., Macia A., Reguant J., Angles N., Morelló J.R., Motilva M.J. (2010). Comparative study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to determine procyainidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 298-305.

Osakabe N., Baba S., Yasuda A., Iwamoto T., Kamiyama M., Tokunaga T., Kondo K. (2004). Dose-response study of daily cocoa intake on the susceptibility of low-density lipoprotein in healthy human volunteers. *Journal of Health Science*, 50: 679-684.

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

Othman A., Jalil A.M., Weng K.K., Ismail A., Ghani N.A., Adenan I. (2010). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *African Journal of Biotechnology*, 9: 1052-1059.

ayne M.J., Hurst W.J., Stuart D.A., Ou B., Fan E., Ji H., Kou Y. (2010). Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. *Journal of AOAC international*, 93: 89-96.

Porter L.J., Chan B.G. (1991). Cacao procyanidins: Major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, 30: 1657-1663.

Prior R.L., Gu L. (2005). Ocurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66: 2264-2280.

Purcărea C., Borbély M., Ónodi D., Chis A. (2012). Health protecting components of cocoa. *Ecotoxicologie, Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentară*, 417-422.

Redgwell R., Trovato V., Merinat S., Curti D., Hediger S., Manez A. (2003). Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81: 103-112.

Redovnikovic I. R., Delonga K., Mazor S., Dragovic-Uzelac V., Caric M., Vorkapic-Furac J. (2009). Polyphenolic content and composition and antioxidant activity of different cocoa liquor. *Czech Journal of Food Science*, 27: 330-337.

Rein D., Paglieroni T.G., Wun T., Pearson D.A., Schmitz H.H., Gosselin R., Keen C.L. (2000). Cocoa inhibits platelet activation and function. *American Journal Clinical Nutrition*, 72: 30-35.

Rigaud J., Escribano-Bailon M., Prieur C., Souquet J.M. (1993). Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *Journal of Chromatography*, 654: 255-260.

Robbins R.J., Leonczak J., Johnson J.C., Li J., Kwik- Uribe C., Prior R.L., Gu L. (2009). Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography-fluorescence detection method for the quantification of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. *Journal of Chromatography A*, 1216: 4831-4840.

Rojas F.L., Londoño J., Gallego A.M., Herrera A.L., Aguilera C., Atehortua L. (2008). Total polyphenols analysis of mature seeds and tissue cultures of some colombian cocoa varieties. *Actual Biology*, 30: 117-123.

Roura E., Andres-Lacueva C., Jauregui O., Badia E., Estruch R., Izquierdo-Pulido M., Lamuela-Raventos R.M. (2005). Rapid liquid chromatography tandem

mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 6190-4.

Roura E., Andrés-Lacueva C., Estruch R. Mata-Bilbao M.L., Izquierdo-Pulido M., Waterhouse A.L., Lamuela-Raventós R.M. (2007). Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. *Annals of Nutrition Metabolism,* 51:493–498.

Roura E., Andres-Lacueva C., Estruch R., Lourdes Mata Bilbao M., Izquierdo-Pulido M., Lamuela-Raventos R.M. (2008). The effects of milk as a food matrix for polyphenols on the excretion profile of cocoa (−)-epicatechin metabolites in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 100: 846–851.

Rusconi M., Conti A. (2010). *Theobroma cacao L.,* the food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61: 5-13.

Sanchez-Rabaneda F., Jauregui O., Casals I., Andres-Lacueva C., Izquierdo-Pulido M., Lamuela-Raventos R.M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (Theobroma cacao). *Journal of Mass Spectrometry*, 38: 35-42.

Sastre Gallego A. (2010). Nutrición: historia y cultura. Juárez Iglesias M. y Perote Alejandre A. (Coord.). En: Alimentos Saludables y de Diseño Específico, Ed. IM&C, España. 17-28.

Schramm D.D., Karim M., Schrader H.R., Holt R.R., Kirkpatrick N.J., Polagruto J.A., Ensunsa J.L., Schmitz H.H., Keen C.L. (2003). Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Science*, 73: 857-859.

Schroeter H., Holt R.R., Orozco T.J., Schmitz H.H., Keen C.L. (2003). Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature*, 426: 787-788.

Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C.L., Hollenberg N.K., Sies H., Kwik-Uribe C., Schmitz H.H., Kelms M. (2006). Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Science*, 103: 1024-9.

Serafini M., Bugianesi R., Maiani G.,Valtuena S., De Santis S. y Crozier A. (2003). Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, 424, 1013.

Serra J., Ventura F. (1999). Protein quality assessment in cocoa husk. *Food Research International*, 32: 201-208.

Serra A., Macia A., Romero M.P., Valls J., Blade C., Arola L., Motilva M.J. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in vitro and in vivo models. *British Journal of Nutrition*, 103: 944–952.

Shimada Y., Goto H., Kogure T., Shibahara N., Sakakibara I., Sasaki H., Terasawa K. (2001). Protective effect of phenolics compunds isolated from the hooks and stems of Uncaria sinensis on glutamate-induced neuronal death. *The American Journal of Chinese Medicine*, 29: 173-180.

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal Enology. Viticulture*, 16: 144-158.

Steinberg F. M., Bearden M.M., Keen C. L. (2003). Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association*, 103: 215-223.

Tanaka, Masahiro, Terauchi, Masakazu. (1999). Cocoa powder rich in polyphenols, process for producing the same and modified cocoa containing the same**.** United States patent *6,485,772*, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

Taubert D., Roesen R., Lehmann C., Jung N., Schömig E. (2007). Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide. A randomize control trial. *JAMA*, 298: 49-60.

Timbie D.J., Keeney P.G. (1977). Extraction, fractionation, and amino acid composition of Brazilian comun cacao proteins. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*, 25: 424-426.

Tomás Barberán F, Espín de Gea J.C. (2010). Constituyentes bioactivos no-nutricionales con actividad antioxidante. En: Alimentos Saludables y de Diseño Específico. Ed. IM&C, España. 75-95.

Urpi-Sarda M., Monagas M., Khana N., Lamuela-Raventos R.M., Santos-Buelga C., Sacanellab E., Castell M., Permanyer J., Andrés-Lacueva C. (2009). Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394:1545–1556.

Urpi-Sarda M., Llorach R., Khan N., Monagas M., Rotches-Ribalta M., Lamuela-Raventos R., Estruch R., Tinahones F.J., Andres-Lacueva C. (2010). Effect of milk on the urinary excretion of microbial phenolic acids after cocoa powder consumption in humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58: 4706–4711.

Walters M.R., Williamson C., Lunn K., Munteanu A. (2013). Chocolate consumption and risk of stroke: A prospective cohort of men and meta analysis. *Neurology*, 80: 1173-1175.

Warri A., Makela S., Hilakivi-Clarke L. (2008). The role of early life genistein exposures in modifying breast cancer risk. *British Journal of Cancer*, 98:1485-1493.

Waterhouse A.L., Shirley J.R., Donovan J.L. (1996). Antioxidants in chocolate. *The Lancet*, 348: 834.

Wollgast J., Anklam E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33: 423-447.

Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4026-4037.

Wu H., Flint A.J., Qi Q., van Dam R.M., Sampson A., Rimm E.B., Holmes M.D., Willett W.C., Hu F.B., Sun Q. (2015). Association between dietary whole grain intake and risk of mortality: two large prospective studies in US men and women. *JAMA Internal Medicine,* 175: 373–384.

Yamaguchi M. (2014). Osteoporosis treatment with functional food factor: vitamin K_2. *Journal of Osteoporosis and Physical Activity*, 2: 1-3.

Zapata S., Tamayo A., Rojano B.A. (2015). Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68: 7497-7507.

CAPÍTULO 10

Resumen / Abstract

RESUMEN

Actualmente, existe un interés creciente por la demanda de alimentos saludables que puedan tener un efecto beneficioso para la salud de los consumidores. La evidencia científica avala que el consumo de determinados compuestos presentes en los alimentos de forma natural, tiene una relación inversa con la disminución del riesgo de padecer determinadas enfermedades, como son las enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades degenerativas.

Entre estos componentes presentes en los alimentos de origen vegetal, los (poli)fenoles son considerados potentes antioxidantes con numerosos efectos beneficiosos, ya que su consumo se ha relacionado con una disminución de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. El grano de cacao y los productos derivados del cacao, destacan por tener una alto contenido en (poli)fenoles, tales como las catequinas, procianidinas y antocianidinas. Sin embargo, numerosos trabajos científicos han demostrado que desde la recogida del grano de cacao hasta el producto final elaborado, se producen pérdidas de estos compuestos bioactivos en todas las etapas del procesado. Por lo tanto, es muy importante extremar las condiciones de manipulación durante todo el procesado con la finalidad de reducir las pérdidas de estos compuestos antioxidantes en el producto final.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido desarrollar y obtener un ingrediente natural de cacao con un alto contenido en (poli)fenoles y con una alta capacidad antioxidante, y que pueda ser apto como ingrediente para su aplicación en productos alimenticios.

En las primeras etapas se realizó un estudio del grano de cacao para seleccionar la materia prima con un elevado contenido de (poli)fenoles, de manera que pudiese asegurar una mayor concentración de los mismos en etapas posteriores de procesado. Asimismo, se evaluaron los efectos de diferentes procesos tecnológicos (escaldado, desgrasado y tratamiento

térmico) sobre los contenidos en (poli)fenoles totales y flavanoles, con la finalidad de introducir nuevas etapas en el procesado para conseguir un polvo de cacao desgrasado con un perfil fenólico mejorado. De este modo se consiguió el desarrollo industrial de un ingrediente de cacao rico en (poli)fenoles totales y flavanoles que fue utilizado en la formulación de un chocolate negro.

Los resultados obtenidos muestran que el proceso de fermentación y tostado del grano producen una disminución significativa del contenido de (poli)fenoles totales en los distintos granos de cacao estudiados, observando el mayor contenido de estos compuestos en el “nib”. El genotipo identificado como el clon CCN51, producido en Ecuador, es el tipo de cacao con el contenido más alto de (poli)fenoles. La inactivación de la enzima polifenol oxidasa mediante un escaldado con agua a 95 ºC y 5 minutos, redujo las pérdidas de (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidina B2, así como el contenido de (poli)fenoles totales. Por ello, el empleo de “nib” de cacao procedente de semillas no fermentadas con la enzima polifenol oxidasa inactivada, es una buena alternativa como materia prima para obtener un ingrediente de cacao con un mayor contenido en flavanoles. El prototipo de cacao en polvo desgrasado por Soxhlet a partir de semillas con la enzima polifenol oxidasa inactivada, representó un polvo de cacao no afectado por variables postcosecha, manteniendo la concentración de (poli)fenoles presentes en la materia prima. El prototipo óptimo fue escalado a nivel piloto mediante un desgrasado con CO_2 supercrítico, resultando en un mayor contenido de (poli)fenoles totales y de flavanoles, así como en una capacidad antioxidante superior a los valores encontrados en un polvo de cacao convencional.

La aplicación posterior de un tratamiento térmico con calor húmedo a 121 ºC y 1 minuto no afectó al contenido de (poli)fenoles, obteniendo un ingrediente de cacao desgrasado con un elevado contenido de procianidinas oligoméricas (de monómeros a decámeros) y polímeros. La formulación de un chocolate negro empleando un 15% de este ingrediente, ha dado lugar a un enriquecimiento notable de las fracciones de procianidinas oligoméricas

(desde monómeros hasta hexámeros), y de (-)-epicatequina, (+)-catequina y los dímeros B1 y B2, cuando se compararon los valores con los de un chocolate negro formulado empleando un 15% de polvo de cacao convencional.

Aunque la actividad biológica de este ingrediente no ha sido objeto de este estudio, la caracterización del mismo, en cuanto a su perfil (poli)fenólico, abre nuevas líneas de investigación, dirigidas al estudio de la funcionalidad de dicho ingrediente evaluando tanto *in vitro* como *in vivo* sus efectos beneficiosos relacionados con los mecanismos de estrés oxidativo.

ABSTRACT

Currently, there is growing interest in the demand for healthy foods that can have a beneficial effect on the health of consumers. The scientific evidence supports that the intake of certain compounds present naturally in foods has an inverse relationship with reduced risk of some diseases, such as cardiovascular disease, cancer and other degenerative diseases.

Among the components present in food of plant origin, (poly)phenols are considered powerful antioxidants with numerous beneficial effects, as their consumption has been linked to a decrease of diseases related to oxidative stress. Cocoa beans and cocoa products are characterized by having a high content of (poly)phenols such as catechins, procyanidins and anthocyanidins. However, numerous scientific studies have shown that from the collection of the cocoa bean to the final product produced, part of these bioactive compounds are lost at the different processing stages. Therefore, it is important to optimize the handling conditions throughout the whole process in order to reduce losses of these antioxidant compounds in the final product.

The overall objective of this PhD thesis has been to develop and obtain a natural cocoa ingredient with a high content in (poly)phenols and with high antioxidant capacity, which may be also suitable as an ingredient for use in food products.

In the first part of the thesis, a study of the cocoa bean was performed to select raw materials with a high content of (poly)phenols, so that a great concentration of these compounds could be guaranteed thereof in subsequent processing steps. Also, the effects of various processes (blanching, defatting process and heat treatment) on the contents of (poly)phenols and flavanols were evaluated, in order to introduce new steps in the conventional processing for the production of defatted cocoa powder with an improved phenolic profile. This way, the industrial development of a

cocoa ingredient rich in (poly)phenols and flavanols was achieved, which was then used in the formulation of a dark chocolate.

The results show that the fermentation and roasting of the bean produce a significant decrease in the total content of (poly)phenols in the different cocoa beans studied, the highest content of these compounds being observed in the “nib”. The genotype identified as CCN51 clone, produced in Ecuador, is the type of cocoa with the highest content of (poly)phenols. Inactivating the polyphenol oxidase by blanching with water at 95 °C and 5 minutes, reduced losses of (-)-epicatechin, (+)-catechin, and procyanidin B2, as well as the total content of (poly)phenols. Therefore, the use of cocoa “nib” from unfermented beans with the polyphenol oxidase inactivated seems to be a good alternative as a raw material to obtain a cocoa ingredient with an increased content of flavanols. The prototype of cocoa powder defatted by Soxhlet from seeds with the polyphenol oxidase inactivated, represented a cocoa powder unaffected by postharvest variables, maintaining the concentration of (poly)phenols present in the raw material. The optimum prototype was taken to pilot scale level by defatting with supercritical CO_2, this resulting in a higher content of total (poly)phenols and flavanols, as well as an antioxidant capacity higher than that found in a conventional cocoa powder.

The subsequent application of a heat treatment with moist heat at 121 °C during 1 minute did not affect the (poly)phenols content, obtaining a defatted cocoa ingredient with a high content of oligomeric procyanidins (from monomers to decamers) and polymers. Formulating a dark chocolate using 15% of this ingredient resulted in a significant enrichment of the fractions of oligomeric procyanidins (from monomers to hexamers), and of (-)-epicatechin, (+)-catechin and B1 and B2 dimers, when the values were compared with those of a dark chocolate prepared using 15% of a conventional cocoa powder.

Although the biological activity of this ingredient has not been the subject of this study, its characterization regarding its (poly)phenolic profile,

open new research lines aimed at the study of the functionality of this ingredient, evaluating both *in vitro* and *in vivo* its beneficial effects related to oxidative stress mechanisms.