

**ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CATEQUINAS
PRESENTES EN CACAOS COLOMBIANOS DURANTE LOS
PROCESOS DE PRE E INDUSTRIALIZACIÓN**

JORGE ANDRES GIL QUINTERO



**FACULTAD DE QUIMICA FARMACEUTICA
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACEUTICAS
Medellín
2012**

**ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CATEQUINAS
PRESENTES EN CACAOS COLOMBIANOS DURANTE LOS
PROCESOS DE PRE E INDUSTRIALIZACION**

JORGE ANDRES GIL QUINTERO

**Trabajo de grado para optar al título de magíster en Ciencias
Farmacéuticas**

Director:

MSc. Jelver Alexander Sierra Restrepo

Coasesores:

Ph.D. Edison Javier Osorio Durango

MSc. Diego Fernando Rojas Vahos



**GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN SUSTANCIAS BIOACTIVAS
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA**

Medellín

2012

**ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CATEQUINAS
PRESENTES EN CACAOS COLOMBIANOS DURANTE LOS
PROCESOS DE PRE E INDUSTRIALIZACION**

JORGE ANDRES GIL QUINTERO

“Prohibida la reproducción sin la autorización expresa del autor”

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
Medellín
2012**

DEDICATORIA

Dedicada a mis padres, a quienes agradezco todas sus enseñanzas.

Sin ellos no habría llegado a ser la persona que soy hoy.

AGRADECIMIENTO

A mi director de tesis, el profesor Jelver Alexander Sierra y a los profesores Diego Fernando Rojas y Edison Javier Osorio por su acompañamiento durante la ejecución de este trabajo.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto número 2008E3776-3762, del cual derivó este trabajo; y a la Compañía Nacional de Chocolates por su apoyo financiero, técnico y logístico para la consecución del material vegetal y la realización de los muestreos en campo.

Al Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (Sede de Investigaciones Universitaria SIU, Laboratorio 229), donde logre desarrollar parte de mis sueños académicos y profesionales. A todos sus integrantes, tanto actuales como antiguos.

Muy especialmente al profesor Julian Alberto Londoño de la Corporación Universitaria Lasallista, a quien he considerado mi modelo a seguir desde el momento en el que comencé a trabajar con él. Por sus innumerables e importantes consejos, además de su incondicional apoyo durante todo mi proceso de formación, MUCHAS GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	12
1 INTRODUCCIÓN	13
1.1 Theobroma cacao	13
1.2 El cultivo de cacao, agroindustria en Colombia y nuevas perspectivas en el mercado	14
1.3 Polifenoles en plantas	18
1.3.1 El cacao como fuente de polifenoles.....	19
1.4 De los granos de cacao al chocolate: Alteraciones en la composición y contenido de catequinas	21
1.4.1 Proceso de preindustrialización del cacao.....	21
1.4.2 Proceso de industrialización de cacao: efecto sobre el contenido de polifenoles.....	24
2 OBJETIVOS	29
2.1.1 Objetivo General	29
2.1.2 Objetivos específicos	30
CAPITULO 1	31
3 DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINAS PRESENTES EN CACAOS COLOMBIANOS	31
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1.1 Material vegetal.....	31
3.1.2 Preparación de muestras: Efecto del almacenamiento	32
3.1.3 Preparación de muestras: Desengrase y extracción.....	32
3.1.4 Optimización de la extracción: Extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido (EAU)	33
3.1.5 Contenido de polifenoles totales	35

3.1.6	Identificación y cuantificación de catequinas y xantinas por Cromatografía Líquida de alta Eficiencia (HPLC)	35
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.2.1	Desarrollo del método analítico para la identificación y cuantificación de catequinas presentes en cacaos colombianos	38
CAPITULO 2.....		63
4	IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS CLAVE DE PÉRDIDA DE CATEQUINAS DURANTE LOS PROCESOS DE PRE E INDUSTRIALIZACIÓN DEL CACAO Y OPTIMIZACIÓN LAS VARIABLES IDENTIFICADAS COMO CRÍTICAS.....	63
4.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
4.1.1	Muestreo en campo (Preindustrialización)	65
4.1.2	Muestreo en industrialización.....	67
4.1.3	Preparación de las muestras	68
4.1.4	Descripción de los métodos de análisis	69
4.1.5	Optimización de las variables críticas que afectan el contenido de polifenoles y catequinas.....	74
4.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
4.2.1	Identificación de los puntos clave de pérdida de catequinas durante los procesos de pre e industrialización del cacao	76
4.2.2	Optimización de las variables identificadas como críticas en el procesamiento del cacao, para la obtención de productos con alto contenido de polifenoles.....	99
CONCLUSIONES		108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		112

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Principales productores de granos de cacao a nivel mundial en el periodo 2005 – 2010.	15
Tabla 2. Definición de variables para el diseño factorial	34
Tabla 3. Fases estacionaria y móvil utilizadas en la estandarización del método para la cuantificación de los analitos catequina, epicatequina, cafeína y teobromina.	36
Tabla 4. Condiciones optimas para la extracción de polifenoles y xantinas presentes en el cacao.	50
Tabla 5. Idoneidad del sistema cromatográfico de separación, utilizando la fase móvil Acetonitrilo-Ácido acético 0.2%: Agua.	53
Tabla 6. Idoneidad del sistema cromatográfico de separación, utilizando la fase móvil Metanol-Ácido acético 0.1%: Agua.	57
Tabla 7. Parámetros de validación del método de cuantificación.	61
Tabla 8. Diseño experimental para evaluar el efecto de las variables de secado sobre el contenido de polifenoles totales.	75
Tabla 9. Cambios en la concentración de metilxantinas durante la fermentación del cacao.	80
Tabla 10. Contenido de polifenoles totales en granos de cacao no fermentado y secados al sol, provenientes de diferentes orígenes geográficos. Los resultados son expresados en equivalentes de ácido gálico en base seca.	81
Tabla 11. Constantes cinéticas K_m y V_m y especificidad de sustrato para PPO de cacao.	89
Tabla 12. Parámetros cinéticos para los 3 sistemas de secado.	103

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Exportaciones colombianas de cacao y sus subproductos entre los años 2002 y 2009.	16
Figura 2. Ruta biosintética de flavonoides.	19
Figura 3. Evolución del desarrollo del sistema cromatográfico para la separación de catequinas del cacao por variaciones en la fase móvil.	40
Figura 4. Comparación de los perfiles de humedad de granos de cacao almacenados o no a -20°C.	42
Figura 5. a) Curva de calibración para el análisis de polifenoles totales y b) efecto del proceso de desengrase sobre el contenido de polifenoles totales en muestras de cacao seco.	44
Figura 6. Efecto del desengrase sobre el perfil cromatográfico de las muestras de cacao.	45
Figura 7. Gráficos de superficie respuesta para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de a) polifenoles totales, b) epicatequina, c) cafeína y d) teobromina.	47
Figura 8. Diagramas de Pareto para la identificación del efecto de las variables de extracción sobre el contenido de a) polifenoles totales y b) Epicatequina en las muestras sometidas a la optimización de la extracción.	50
Figura 9. Sistema cromatográfico 1 optimizado. a) Estándares a 25µg/mL. b) Muestra de cacao. c) Muestra de cacao con catequina estándar adicionada. El orden de retención de los analitos en los cromatogramas es 1) Teobromina, 2) Catequina, 3) Cafeína y 4) Epicatequina, X) Compuesto no identificado.	54
Figura 10. Sistema cromatográfico 2 optimizado. a) Estándares a 25µg/mL. b) Muestra de cacao. El orden de retención de los analitos en ambos cromatogramas es 1) Teobromina, 2) Catequina, 3) Cafeína y 4) Epicatequina.	56

- Figura 11.** Linealidad y curva de calibración de a) catequina, b) epicatequina, c) cafeína y d) teobromina. 59
- Figura 12.** Esquema de los puntos de muestreo en el diagrama general del proceso. 64
- Figura 13.** Contenido de polifenoles totales en granos fermentados y secos procedentes de 10 áreas de producción (fincas o parcelas) proveedoras de la marca Santander. 76
- Figura 14.** Apariencia externa de los granos de cacao en proceso de preindustrialización. (F1-F5) Fermentación, (S1-S5) Secado al sol. 78
- Figura 15.** Contenido de a) polifenoles totales, b) catequina, c) Epicatequina, d) Actividad antioxidante por el método ORAC, e) Contenido de Cafeína y f) Contenido de Teobromina en las muestras de cacao o derivados en los procesos de pre e industrialización. 83
- Figura 16.** Correlación entre la actividad antioxidante por el método ORAC y (a) Contenido de polifenoles totales, (b) Contenido de catequina y c) Contenido de epicatequina. 84
- Figura 17.** Comparación de la actividad PPO y la variación en el contenido de metabolitos durante las etapas del proceso de preindustrialización. a) Actividad PPO, b) Contenido de polifenoles totales, c) Contenido de epicatequina, d) contenido de catequina. 86
- Figura 18.** Correlación entre la actividad polifenol oxidasa (PPO) y a) Contenido de Epicatequina, b) Contenido polifenoles totales, c) Contenido de Catequina y d) actividad antioxidante por el método ORAC. 88
- Figura 19.** Modelo enzimático de Michaelis-Menten para la determinación de las constantes cinéticas K_m y V_m de la polifenol oxidasa de cacao teniendo como sustratos a) Epicatequina y b) catequina. 89
- Figura 20.** Efecto de diferentes tipos de fermentación sobre el contenido de Catequinas. 90
- Figura 21.** Estructuras químicas de las principales catequinas en cacao y 92

sus respectivos enantiómeros.

Figura 22. Efecto de las catequinas Epicatequina (■) y Catequina (◇) 95 sobre la inhibición de la peroxidación lipídica de la LDL.

Figura 23. Desarrollo del sistema cromatográfico quiral para la 96 separación de los epímeros de catequina y epicatequina presentes en las muestras de cacao provenientes de los procesos de pre e industrialización.

Figura 24. Comparación de tiempos de retención entre a) una mezcla de 97 estándares (catequina y epicatequina a 50mg/L) y b) una muestra de granos de cacao fermentado.

Figura 25. Variaciones en las áreas de pico observadas para los 99 extractos provenientes del primer día de fermentación, final de la fermentación e inicio del secado, final del secado e inicio de la industrialización y obtención del licor de cacao.

Figura 26. Curvas de secado realizadas con granos fermentados en los 102 diferentes sistemas de secado: a) Horno de convección sin recirculación de aire, b) Horno de convección con recirculación de aire, c) Horno infrarrojo.

Figura 27. Efecto de las variables Tiempo y Temperatura de secado 105 sobre el contenido de polifenoles totales, cuando el cacao es sometido a un proceso de secado controlado en a) un horno de convección sin recirculación de aire, b) un horno de convección con recirculación de aire y c) un horno infrarrojo.

Figura 28. Comparación de la pérdida de polifenoles totales entre el 107 secado artificial con un horno infrarrojo a 50°C y el secado natural.

RESUMEN

Los procesos de poscosecha afectan en gran medida la calidad de los granos de cacao. Una adecuada fermentación, secado en campo e industrialización, son esenciales para la obtención de productos finales de alta calidad. Por lo tanto, es importante evaluar el comportamiento de los principales componentes en los granos durante la poscosecha, ya que variaciones en su contenido están directamente relacionadas con cambios en la posible actividad biológica, además del desarrollo de sabores y aromas en los chocolates. Por ende, para evaluar los cambios en la composición de catequinas y xantinas presentes en el cacao, su relación con la actividad antioxidante y la actividad polifenol oxidasa (PPO), se planteó un trabajo que consistió en el rastreo de un mismo lote de cacao seleccionado, durante todas las etapas de poscosecha y transformación, con el fin de detectar el efecto del proceso sobre la composición de las muestras, posterior al desarrollo de un método analítico validado, que permitió la cuantificación de los metabolitos en todos los estadios de la cadena de producción de chocolates. Una vez validado el método analítico, se encontró en general que el contenido de metabolitos y la actividad antioxidante de los productos intermedios, disminuyó durante todas las etapas del procesamiento. Además de esto, finalmente se estableció que el secado en horno infrarrojo, permite la conservación de los polifenoles, siendo además más eficiente en términos de tiempo y por lo tanto, podría ser utilizado para la producción de alimentos con valor agregado desde las etapas tempranas del procesamiento.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Theobroma cacao*

El fruto del cacao, de tamaño promedio de 20 cm de largo por 10 cm de ancho, y peso aproximado de 400 a 500g, es la base de la elaboración del chocolate.

El cacao se clasifica en tres variedades: el Criollo, el Forastero y el Trinitario [1]. El primero es conocido como cacao fino, produce un fruto aromático, afrutado y dulce, pero tiene bajos rendimientos. Se cultiva principalmente en Centro y Sur América, aunque cada vez en menor proporción. El Forastero (amelonado) se obtiene de árboles que crecen más rápidamente y producen mejores rendimientos que el criollo, se cultiva en África y en algunos países de Centro y Sur América. Esta variedad incluye otros subtipos como: el Común en Brasil, el amelonado de África del este, el Matina o Ceylan en Costa Rica y el Cacao Nacional de Ecuador, el cual produce granos con un aroma agridulce y se le reconoce como uno de los cacaos más finos del mundo, a pesar de provenir de una variedad que produce cacaos “ordinarios”. Por último, el Trinitario es una variedad obtenida por el cruce entre criollo y forastero, tiene un sabor condimentado (especias) y un aroma floral. Esta variedad se comenzó a sembrar en Trinidad y Tobago y después se extendió a Venezuela, Ecuador, Camerún, Sri Lanka, la Isla de Java y Papúa Nueva Guinea y también se cultiva en Centroamérica y Asia [2].

1.2 El cultivo de cacao, agroindustria en Colombia y nuevas perspectivas en el mercado

El cacao ocupa el tercer lugar después del azúcar y el café en el mercado mundial de materias primas. De acuerdo a reportes realizados por la FAO, la producción mundial de cacao debió tener una tasa de crecimiento anual de 2.2% desde 1998-2000 hasta el año 2010, comparado con una tasa de 1.7% en los diez años anteriores, y se estimó que en el 2010 llegaría a 3.7 millones de toneladas. No obstante, en el periodo 2005-2008 el crecimiento fue aproximadamente de 6%, con una producción final de 4.3 millones de toneladas. Siendo constante aun, el hecho de que el cacao se produce comúnmente en regiones poco desarrolladas económicamente (Tabla 1), pero es consumido principalmente en los países desarrollados [3, 4].

Colombia no juega un papel preponderante entre los países productores de cacao, aunque la cuenca amazónica es el centro de origen de esta especie. En el año 2010 el país ocupó la décima posición con un aporte de 1.13% de la producción de cacao mundial (Tabla 1), además, según las proyecciones de la FAO en el periodo de años 2000-2010 la producción colombiana tendría que haber disminuido en un 3.1% [3]. Sin embargo, durante los años 2004 a 2010 la producción de cacao creció aproximadamente un 10% de acuerdo a Fedecacao [5]. En términos de valor, la producción en el 2004 fue de \$111.073 millones de pesos, mientras que en 2008 llegó a \$134.178 millones de pesos, presentando un crecimiento del 21%, solo en ese periodo [4].

Tabla 1. Principales productores de granos de cacao a nivel mundial en el periodo 2005 – 2010.

MILES DE TONELADAS						
No.	AFRICA	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10
1	CAMERUM	171,1	269,1	184,8	226,6	205
2	COSTA DE MARFIL	1.407,8	1.229,3	1.382,4	1.223,2	1.190
3	GHANA	740,5	614,5	729	662,4	645
4	NIGERIA	210	220	230	250	260
5	OTROS PAISES	125,9	33,5	166,5	158	169
	Total Africa:	2.655,3	2.366,4	2.692,7	2.520,2	2.469

No.	AMERICA	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10
1	BRASIL	161,6	126,2	170,5	157	150
2	COLOMBIA	36,8	29,6	27,4	35,5	40,5
3	REP. DOMINICANA	45,9	42,2	45,3	55	55
4	ECUADOR	117,5	123,5	27,5	130	140
5	MEXICO	34,1	32,5	27,5	31,5	33
5	PERU	31,4	31,4	34	35,9	35
5	VENEZUELA	19,5	22,6	16,6	20,5	20
5	OTROS PAISES	14,4	14,6	16,4	17,5	16,8
	Total América:	461,2	422,6	488,7	482,9	498,3

No.	ASIA Y OCEANIA	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10
1	INDONESIA	585	545	485	490	525
2	MALASIA	33,9	32,8	30,6	22,4	18
3	NUEVA GUINEA	51,1	49,3	51,5	51	57
4	INDIA	10,2	10,2	10,6	11,8	13
5	OTROS PAISES	14	13	13,1	14,3	16
	Total Asia-Oceanía:	694,2	650,3	590,8	589,5	629
	TOTAL MUNDIAL:	3.810,7	3.439,3	3.732,2	3.592,6	3.596,3

Fuente: Fedecacao, 2011 [5].

En el contexto del mercado internacional, el cacao en grano es el producto que más se comercializa, y se clasifica en 2 categorías: el cacao corriente y el cacao fino. Este último representa el 5% de la producción mundial y según la Organización Internacional de Cacao (ICCO 2005), el 100% del cacao exportable de Colombia se clasifica como cacao fino y de aroma, el cual es empleado para darle características especiales de sabor a los chocolates finos [6]. De acuerdo con Fedecacao, en Colombia el consumo per cápita anual de cacao es de 0.8 kilos y en general en los últimos años se ha constatado que dicho consumo es cercano

al 80% de la producción nacional, dado que el promedio de exportaciones no representa más del 21% del total de la producción [4]. Por tal razón, nuestro país tiene volúmenes de exportación muy pequeños en comparación con los reportados por los principales países exportadores, que como es lógico resultan ser los principales productores. En 2002, las exportaciones colombianas de cacao y sus diferentes subproductos alcanzaron las 15.937 toneladas, y en 2009, 21.934 toneladas, implicando un incremento en el valor de las exportaciones del 110%, representado en 66.3 millones de dólares al término del año 2009 (Figura 1) [4]. Es posible concluir entonces, que la industria chocolatera es una de las agroindustrias con mayor importancia en nuestro país, pues presenta una importante participación en la industria de alimentos nacional [6].

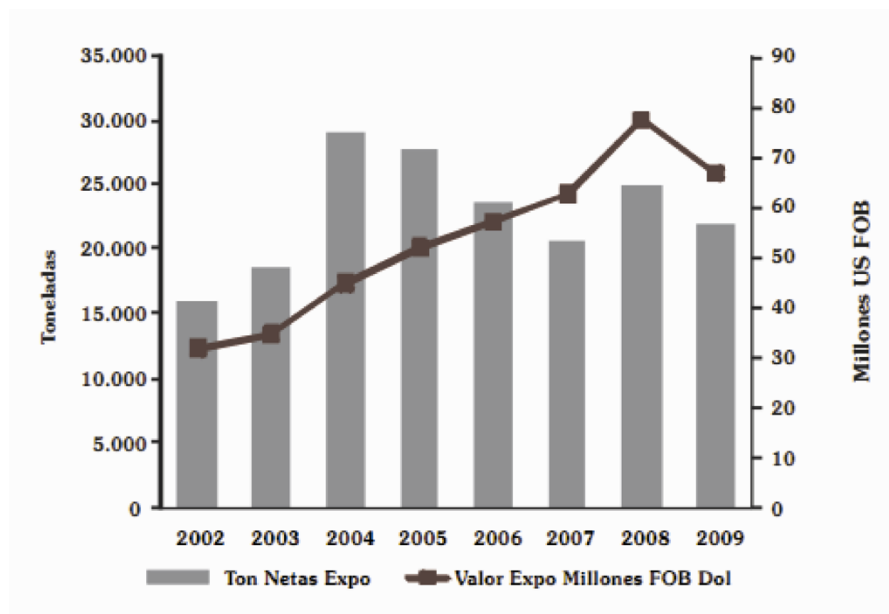


Figura 1. Exportaciones colombianas de cacao y sus subproductos entre los años 2002 y 2009 [4].

En años recientes a nivel mundial se ha venido promoviendo el incremento en el consumo regular de alimentos y bebidas a base de especies vegetales (frutas y verduras), ya que investigaciones emergentes continúan soportando que dietas en las que se incluyen estas fuentes dietarias, presentan grandes beneficios para la salud humana. En este sentido, existe además una presión sobre las industrias de alimentos, que promueve la producción de este tipo de productos, con el fin de reducir los altos costos generados como consecuencia de malos hábitos alimenticios, y por su parte, los consumidores en todo el mundo han tomado conciencia acerca del impacto sobre la salud que representa el consumo de alimentos cuyos ingredientes sean inocuos y de alta calidad.

El consumo de productos a base de cacao, principalmente el chocolate, no ha sido considerado como una práctica de estilo de vida saludable por su alto valor calórico [7]; sin embargo, siendo consistentes con las nuevas tendencias en el mercado de alimentos, estudios recientes sugieren que el cacao y sus derivados además de tener gran aceptación por parte de los consumidores, presentan múltiples beneficios para la salud debido a que son una fuente rica en polifenoles, capaces de modular eventos oxidativos vinculados con la aparición de enfermedades cardio y cerebrovasculares [7].

1.3 Polifenoles en plantas

Los polifenoles son uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuamente distribuidos entre las especies vegetales, con más de 8.000 estructuras químicas reportadas hasta el momento, que se caracterizan por tener en su estructura química al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y frecuentemente se encuentran como derivados de ésteres, éteres y glucósidos [8, 9].

El contenido (cualitativo y cuantitativo) de polifenoles en vegetales varía con las condiciones de crecimiento y los estímulos ambientales; difiere también de una especie a otra, y de un tejido a otro, encontrándose principalmente en frutas, donde el grado de madurez e incluso el manejo poscosecha de los mismos afectan el contenido de polifenoles. Sus funciones fisiológicas están relacionadas con la protección frente a la radiación UV y a las condiciones de estrés biótico como herbivoría, infección, parasitismo y patogénesis de las plantas [10, 11].

Entre los polifenoles de las plantas se pueden encontrar moléculas simples como ácidos fenólicos, fenilpropanoides y flavonoides o compuestos polimerizados como ligninas, melaninas y taninos [12]. Sin embargo, los flavonoides caracterizados por presentar un sistema $C_6-C_3-C_6$, constituyen uno de los grupos fenólicos más numerosos e importantes. Biosintéticamente, estos compuestos pueden considerarse como tetracétidos de síntesis mixta (Figura 2), ya que utilizan el *p*-cumaroil-CoA como molécula iniciadora, a la cual se unen tres moléculas de

malonil-CoA. El *p*-cumaroil-CoA proviene de la ruta del shiquimato-fenilpropanoides, y el malonil-CoA implica a la ruta del acetato-malonato [8, 13].

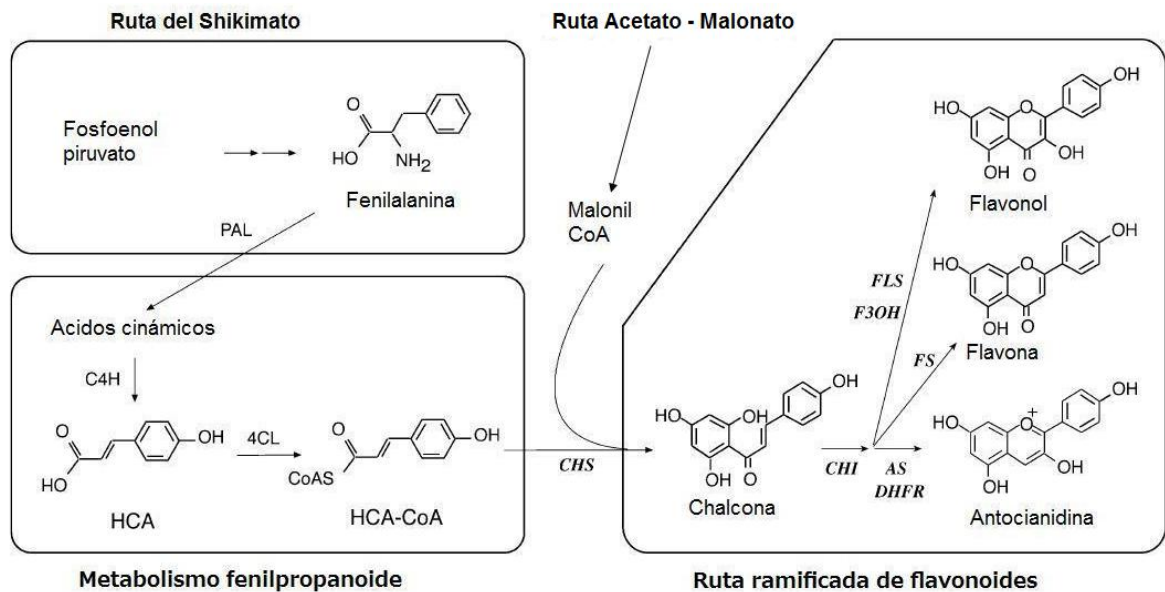


Figura 2. Ruta biosintética de flavonoides. Modificado de Sakihama y Col. (2002) [14].

1.3.1 El cacao como fuente de polifenoles

Los flavonoides ocupan un lugar muy importante entre los antioxidantes naturales provenientes de la dieta. De hecho, una gran diversidad de alimentos de origen vegetal, tanto en su estado natural como procesado, constituyen una fuente variable, pero importante de antioxidantes.

Las manzanas, el té, el vino, entre otros, son alimentos que han sido identificados como ricos en este tipo de polifenoles. Pero sin lugar a dudas, el cacao y sus productos derivados, principalmente el polvo de cacao (cocoa), el chocolate y el licor de cacao, se caracterizan también por tener una alta proporción de estos

compuestos [15]. Los polifenoles encontrados en el grano de cacao se almacenan en las células pigmentadoras de los cotiledones y dependiendo del contenido de antocianinas estas células pueden llegar a tener una tonalidad púrpura oscura. Los grupos de polifenoles más abundantes en cacao son metabolitos tipo flavonoide, especialmente 3 grupos básicos con un núcleo común tipo flavan-3-ol: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es (-)-epicatequina que representa cerca del 30% del contenido de polifenoles del grano [16], otras catequinas minoritarias son (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina. La fracción de antocianinas consiste principalmente de cianidina-3-arabinosa y cianidina-3-D-galactosa y entre las procianidinas, las más abundantes son aquellas unidades diméricas, triméricas y oligoméricas de epicatequina y flavan-3,4-diol [17].

En estudios previos se ha mostrado que el contenido total de polifenoles solubles en los granos de cacao secos y desengrasados de la variedad forastero, varía entre 10-15%, donde el contenido de (-)-epicatequina oscila entre 34.65 y 43 mg/g [16], mientras que los cacaos criollos contienen solo 2/3 partes de este contenido [18].

En general, los polifenoles presentes en el cacao desempeñan un papel importante en la calidad de alimentos derivados, ya que intervienen en su apariencia, color, olor, acidez, e incluso en sus propiedades potencialmente beneficiosas para la salud humana [10]. Estos parámetros son de particular

importancia en la cadena de producción de chocolate, ya que muchos de ellos pueden ser evaluados y tenidos en cuenta por los transformadores de cacao en el mercado, dando lugar a su elección o rechazo.

Adicionalmente, estos compuestos exhiben un amplio rango de efectos biológicos, entre los que se incluyen acciones antibacteriales, antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, anticarcinogénicas y vasodilatadoras, además de ser útiles en la prevención de enfermedades coronarias y desórdenes neurodegenerativos; estas funciones biológicas se han atribuido a su actividad antioxidante y la capacidad para estabilizar radicales libres [19-21].

1.4 De los granos de cacao al chocolate: Alteraciones en la composición y contenido de catequinas

1.4.1 Proceso de preindustrialización del cacao

La mayor parte de los granos de cacao destinados a la producción de chocolate, son sometidos en el lugar de cultivo a los primeros pasos para el procesamiento. Específicamente los procesos de fermentación y secado al sol toman lugar en esta etapa del proceso de producción (preindustrialización), y son importantes para el desarrollo de aromas y/o precursores de aromas en el chocolate [22-24].

Luego de que las mazorcas son cosechadas, las semillas de cacao son removidas y transferidas a cajas de madera donde es llevada a cabo la fermentación, durando de 2 a 3 días cuando se trata de granos de cacao Criollo, y de 5 a 7 días para cacao forastero [25].

Durante el primer día de fermentación, el mucílago adherido a la semilla comienza a drenar líquidos con un aumento constante en la temperatura. Bajo condiciones anaerobias, los microorganismos producen ácido acético y etanol. Estos procesos inhiben la germinación de las semillas y contribuyen a cambios estructurales durante la fermentación de los granos tales como la remoción de enzimas y sustratos compartimentalizados [26]. Los líquidos celulares se mueven a través de la pared celular y se esparcen sobre el grano de cacao, esto ocurre generalmente entre las 24 y 48 horas de la fermentación. Al tercer día, la temperatura del grano aumenta generalmente hasta 45°C, y alcanza los 50°C cuando la fermentación ha terminado [27].

Durante la fermentación de los granos de cacao, los polifenoles difunden desde los compartimientos celulares y se oxidan para producir taninos insolubles de alto peso molecular. Las reacciones de oxidación son catalizadas por la enzima polifenol oxidasa, no obstante, esta enzima es fuertemente inactivada durante el primer día de fermentación, pasando de una actividad enzimática del 50% al 6% durante los días 1 y 2. La ocurrencia de reacciones de condensación es

confirmada por la disminución drástica en el contenido de epicatequina durante el segundo y tercer día de la fermentación [23, 28].

Una vez terminado el proceso de fermentación, los granos son puestos en bandejas y secados al sol en las zonas de cultivo donde la cosecha coincide con una estación seca, mientras que en zonas lluviosas se utiliza secado artificial [29]. El objetivo principal del secado es disminuir la humedad de los granos hasta un 5-7%, para permitir su almacenamiento y transporte, ya que un contenido de humedad superior al 8%, incrementa la probabilidad de contaminación fúngica [30].

Además de la oxidación enzimática durante la fermentación, se ha propuesto que el incremento de temperatura durante el secado en campo es un factor importante vinculado a la pérdida de polifenoles. En general, se ha encontrado que el contenido de polifenoles disminuye drásticamente hasta cerca de un 80% durante estas etapas del procesamiento [31]. Es necesario enfatizar que estos procesos de preindustrialización no están estandarizados a nivel mundial, generando alta variación en la concentración de catequinas de cacao provenientes de diferentes procedencias [23].

1.4.2 Proceso de industrialización de cacao: Efecto sobre el contenido de polifenoles

Una vez los granos secados en campo llegan a la fábrica de producción de chocolates, el primer paso en el proceso de industrialización del cacao es la limpieza del grano mediante una serie de operaciones que incluyen la remoción de fibra procedente de los empaques, trozos de madera, metales e impurezas [32].

El paso subsiguiente es la tosti3n del grano entero, lo cual es clave para el desarrollo de sabores, que ya deber3n existir en el grano, al menos en forma de precursores derivados de una correcta fermentaci3n y secado [33, 34]. Una tosti3n correcta es un proceso dependiente del tiempo y la temperatura, donde el tiempo puede variar entre 5 y 120 minutos y la temperatura entre 120 y 150 °C [35]. Generalmente temperaturas m3s bajas se usan para modificadores de leche y algunos chocolates oscuros. Existe un peque1o paso de pretostado en el que los granos pueden alcanzar temperaturas hasta de 100°C, seguido por la tosti3n misma en donde la temperatura es aumentada alrededor de 130°C. Al tostar el grano, este pierde su cobertura externa la cual es removida f3cilmente y da lugar a la almendra que continuar3 en el proceso [31].

El siguiente paso en un procesamiento convencional de cacao involucra la molienda de las almendras, la cual se adelanta generalmente en dos etapas, una inicial para convertir la almendra en una pasta fluida y una final en donde se

alcanza el tamaño de partícula deseado. Durante la molienda se genera un fluido café oscuro conocido como "licor" [35-37], que debe su fluidez al rompimiento de la pared celular y posterior liberación de la grasa [31].

Adicionalmente, se separa la manteca de cacao del licor mediante prensas hidráulicas o mecánicas, siendo una fase importante puesto que este producto es adicionado en otras etapas del proceso o comercializado como materia prima para la industria cosmética o alimentaria [35, 38].

Otras etapas pueden involucrar la alcalinización del grano, el licor o el polvo, con suspensiones de álcali, principalmente con el fin de cambiar el color y el sabor [35, 37]; sin embargo, existen dudas acerca de si este último parámetro realmente se afecta. En general la alcalinización no es una etapa indispensable en el proceso de manufactura del chocolate, pero es común para algunos productos como el polvo de cacao oscuro y productos para repostería [31].

Los ingredientes básicos para la manufactura del chocolate son el licor de cacao, azúcar, leche y emulsificantes, estos ingredientes se mezclan generando una pasta de textura áspera y consistencia plástica, la cual es refinada para producir la textura suave deseada en los productos finales. Actualmente el proceso de refinado se lleva a cabo en sistemas de rodillos múltiples donde se controla la presión entre ellos y la temperatura de cada rodillo se mantiene entre 25-50°C.

La pasta refinada es almacenada durante 24 horas a 45-50°C en un proceso conocido como maduración, el cual le da al producto una textura de masa, la cual puede usarse como chocolate de tasa; adicionalmente, un paso final conocido como conchado es esencial para generar chocolates finos; esta etapa es la última en el proceso de manufactura y es esencial para el desarrollo de la textura y sabor final. Generalmente es un proceso de dos pasos en donde inicialmente se reduce la humedad, se eliminan las sustancias volátiles y se distribuye la grasa, de tal manera que las partículas queden distribuidas en una fase continua; en el segundo paso se adiciona la manteca de cacao y un emulsificante como lecitina para dar una pasta líquida homogenizada. Las condiciones de temperatura y tiempo del conchado pueden variar dependiendo del tipo de chocolate, por ejemplo para los chocolates en polvo se utiliza entre 10 y 16 horas a temperaturas entre 49 y 52°C, mientras que para chocolates oscuros el conchado se lleva a cabo a temperaturas más altas, entre 70-82°C [31]. Las condiciones del conchado podrían ser modificadas (acortadas) por pretratamiento del licor, por ejemplo con tratamientos térmicos >100°C.

Antes del servido en moldes, la pasta de chocolate se enfría hasta alcanzar 10°C y se recalienta varias veces a temperaturas entre 29-31°C para lograr una buena cristalización, lo cual garantiza las propiedades reológicas adecuadas en el producto final [31].

Hasta el momento se conoce que las alteraciones en el contenido y composición de polifenoles, en el proceso de manufactura del chocolate y en general los productos derivados del cacao, pueden darse principalmente durante estos procedimientos [37, 39], pues los granos o productos intermedios son expuestos a gran variedad de procesos térmicos que generalmente involucran la presencia de oxígeno; gracias a esto y debido a la alta actividad redox de los polifenoles, es posible anticipar que estos procedimientos son puntos cruciales de los cuales depende la calidad de los productos finales en términos de contenido de compuestos con actividad biológica [31]. No obstante, el conocimiento de estos cambios es limitado y en la actualidad solo un proceso patentado los ha estudiado en relación a los parámetros del proceso [40], encontrando que generalmente temperaturas y tiempos de procesamiento prolongados reducen la cantidad de polifenoles disponibles. Hoy, a pesar que la industria nacional cuenta con tecnología moderna para el procesamiento del cacao, no posee en sus procesos un control estricto en cuanto a conservación de polifenoles y certificación de su contenido en el producto final.

Son numerosos los estudios que han tratado el tema de la composición química del cacao o de sus subproductos, desafortunadamente estos estudios han trabajado con variedades de cacao que en su mayoría no son cultivadas en Colombia, y esto nos sitúa en un lugar de completo desconocimiento acerca de las características de nuestro cacao. Además, la pérdida de catequinas y en general de polifenoles, que se presenta durante los procesos de poscosecha en

preindustrialización e industrialización, conduce a la generación de productos de menor calidad en comparación con los actualmente ofertados en mercados internacionales, en donde se acepta ampliamente que los alimentos derivados del cacao presentan efectos benéficos en la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, debido a sus componentes bioactivos con capacidad de actuar como antioxidantes. Todo lo anterior, justifica la realización de este trabajo enfocado al estudio de variables asociadas a los procesos de pre e industrialización que afectan la estabilidad de las catequinas, soportado también en la hipótesis de que es posible disminuir las pérdidas de estos compuestos modificando dichas variables, principalmente en puntos críticos de los procesos de secado en campo e industrialización.

2 OBJETIVOS

Con el propósito de incrementar el conocimiento acerca de un producto agrícola nacional de gran importancia como lo es el cacao, se propone realizar estudios encaminados a observar la variabilidad de los metabolitos que son considerados importantes actualmente a nivel mundial, debido a que generan valor agregado para los productos derivados de este material vegetal (Chocolates, Cacaos y demás), siendo importante también, el planteamiento de posibles estrategias que permitan la conservación de este tipo de compuestos durante todos los eslabones de la cadena de producción.

2.1.1 Objetivo General

Evaluar la estabilidad de las catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos intermedios de pre e industrialización y determinar la variación en la actividad antioxidante durante dichos procesos.

2.1.2 Objetivos específicos

2.1.2.1 Desarrollar un método analítico para la identificación y cuantificación de catequinas presentes en cacaos colombianos.

2.1.2.2 Identificar los puntos clave de pérdida de catequinas durante los procesos de pre e industrialización del cacao.

2.1.2.3 Optimizar las variables identificadas como críticas en el proceso de pre e industrialización de cacao, determinantes para obtener productos con alto contenido de compuestos fenólicos.

2.1.2.4 Evaluar la actividad antioxidante de los productos obtenidos en cada punto crítico de los procesos de pre e industrialización del cacao.

CAPITULO 1

3 DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CATEQUINAS PRESENTES EN CACAOS COLOMBIANOS

Las metodologías aplicadas en el análisis de polifenoles dependen principalmente del propósito de la investigación. Estas pueden estar encaminadas a la realización de tamizaje en diversas plantas para determinar el contenido total de polifenoles, al aislamiento de moléculas específicas ya conocidas, a determinar la concentración de las mismas o a aislar, identificar y purificar nuevas moléculas. En todos los casos se requiere de una metodología de extracción y un proceso preparación de muestra, previos a los métodos analíticos, haciendo el resultado final dependiente de las variables tenidas en cuenta dentro de estos procedimientos.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Material vegetal

Para este estudio se realizó un muestreo aleatorizado de cacao en parcelas con prácticas agrícolas estandarizadas, ubicadas en el municipio de San Vicente de Chucuri en el departamento de Santander (06° 53' 00"N, 73° 24' 50" O). Durante el muestreo, se recolectaron granos provenientes de mazorcas maduras con un

promedio de 6 a 7 meses de edad. Posteriormente, tanto los granos como las mazorcas fueron lavados y almacenados a -20°C hasta la preparación de los extractos.

3.1.2 Preparación de muestras: Efecto del almacenamiento

Para descartar la posibilidad de error analítico inducido por variaciones en la humedad de los granos sometidos a almacenamiento bajo congelación; se realizó un secado controlado a 45°C en un horno de convección, sobre 3 muestras independientes de 50.0g de granos de cacao recién fermentados, y granos almacenados a una temperatura de -20°C durante 8 días posterior a la fermentación. El pesaje de las muestras se realizó cada hora durante un periodo de 19 horas, hasta obtener una humedad final de los granos inferior al 7%; especificación definida por las empresas procesadoras de cacao para el grano que entra en la etapa de industrialización [30].

3.1.3 Preparación de muestras: Desengrase y extracción

Se tomaron 300.0g de granos de cacao fermentado y se secaron a 45°C durante 24 horas. A partir de estos granos, se tomaron 3 muestras independientes de 20.0g cada una, las cuales se molieron y posteriormente se desengrasaron en soxhlet durante 2 horas utilizando n-hexano como solvente. Luego, los sólidos desengrasados se extrajeron a temperatura ambiente siguiendo el método

propuesto por Niemenak y Col. (2006)[41], con algunas modificaciones. Así, se extrajeron 2.0g de muestra desengrasada con 30.0mL de una mezcla de acetona/agua en proporción 60:40 V/V , durante 1 hora con agitación continua a 200 RPM. El extracto se concentró a presión reducida (50°C) y se centrifugó a 980 RCF durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon (0.45 μ m), se llevó a 25.0mL en un matraz aforado y se almacenó a 4°C y protegido de la luz directa, hasta el momento del análisis de polifenoles totales y perfil cromatográfico.

Adicionalmente, se tomaron 3 muestras de 2.0g de granos sin desengrasar y se sometieron al mismo proceso de extracción, almacenamiento y análisis mencionado anteriormente.

3.1.4 Optimización de la extracción: Extracción convencional y extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Se diseñó un experimento multinivel factorial generalizado para la optimización de los parámetros de extracción. Los factores y los niveles estudiados dentro del diseño se describen en la Tabla 2.

Granos de cacao fermentado se sometieron a secado durante 24 horas a 45°C. Posteriormente cada análisis se realizó con 1.0g de muestra molida, teniendo en cuenta las demás condiciones específicas para cada ensayo definidas en la matriz

de extracción (Tabla 2). El orden de los corridos experimentales se estableció mediante el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1, para asegurar la aleatoriedad de los ensayos. La extracción convencional se realizó en balones de vidrio de fondo plano, mediante agitación continua a 200 RPM de la mezcla solvente y el material vegetal. La extracción asistida por ultrasonido se llevó a cabo en tubos cónicos de 50.0mL sumergidos en un baño ultrasónico Elma-LC60H, (Singen, Germany) operado a una frecuencia de 60 kHz.

Luego de preparados los extractos, estos se concentraron a presión reducida (50°C) y se centrifugaron a 980 RCF, durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nylon (0.45µm), se llevó a 25.0mL en un matraz aforado y se almacenó, protegido de la luz directa, a 4°C hasta el momento de los análisis de contenido de polifenoles totales y cuantificación de epicatequina, cafeína y teobromina.

Tabla 2. Definición de variables para el diseño factorial generalizado.

Factor	Niveles	Variable de respuesta
(A) Tiempo (min)	20 40 60	
(B) Solvente	(1) Acetona:Agua 60:40 (2) Isopropanol:Agua 60:40 (3) Metanol:Agua 60:40	Polifenoles totales Epicatequina Cafeína Teobromina
(C) pH	3.0 9.0	
(D) Método de extracción	(1) Convencional-agitación (2) Ultrasonido	

3.1.5 Contenido de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales de los extractos se determinó por el método Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton (1965) [42], adaptado recientemente por Londoño y Col. (2006) [43]. Se mezclaron 750.0µL de agua ultra pura con 100.0µL de muestra, 100.0µL de una solución de carbonato de sodio 20% y 50.0µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2M, agitando luego de cada adición. La mezcla se incubó 60 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, transcurrido el tiempo se registró la absorbancia a 760nm en un espectrofotómetro Cary 50 (Varian, Palo Alto, CA, USA). El análisis cuantitativo se realizó por el método del estándar externo y para ello se construyó una curva de calibración con ácido gálico (10.0–100.0µg/mL) con el fin de expresar los resultados en términos de Equivalentes de Ácido Gálico (GAE).

3.1.6 Identificación y cuantificación de catequinas y xantinas por Cromatografía Líquida de alta Eficiencia (HPLC)

La identificación y cuantificación de catequinas y xantinas presentes en las muestras de cacao se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia. Se usó un cromatógrafo líquido marca Agilent serie 1200 modelo VL, utilizando un Detector de Arreglo de Diodos (DAD) a una longitud de onda de 280nm. La separación cromatográfica se optimizó modificando las fases estacionaria y móvil, además de la temperatura de la columna, tres de las variables principales de las

que depende la separación de analitos cuando se pretende trabajar en cualquier tipo de análisis cromatográfico (Tabla 3).

Tabla 3. Fases estacionaria y móvil utilizadas en la estandarización del método para la cuantificación de los analitos catequina, epicatequina, cafeína y teobromina.

Fase estacionaria	- Columna Supelco C18 (250x4.6mm). Tamaño de partícula:5µm
	- Columna VARIAN C18 (150x4.6mm). Tamaño de partícula:5µm
Fase móvil	- Columna Phenomenex C18 (100x4.6mm). Tamaño de partícula:5µm
	(1) Acetonitrilo:Agua*
	(2)Metanol:Agua*
	* Incluye una mezcla agua-ácido acético como solvente modificador (0,1-0,2%)

Se empleó ácido acético y fórmico entre 0.1 y 0.2% como modificadores de pH en la fase móvil, se trabajó con flujos de la fase móvil entre 0.5 y 1.0mL y la temperatura de la columna se varió entre 25 y 35°C.

La idoneidad del sistema se determinó con respecto al factor de capacidad y selectividad, además de la resolución, simetría y la desviación en los tiempos de retención de los picos en el cromatograma. La validación del método propuesto incluyó los parámetros linealidad (coeficiente de correlación), rango (µg/mL), límite de detección (LD µg/mL), límite de cuantificación (LC µg/mL), repetibilidad, precisión intermedia y exactitud para los analitos catequina, epicatequina, cafeína y teobromina.

La linealidad se evaluó preparando mezclas de soluciones estándares de trabajo a cinco niveles de concentración, dependiendo de la concentración de analito esperada. El criterio de rango se definió basado en la linealidad del método. El límite de detección (LD) fue la concentración más baja de analito en una muestra, que resultó en una altura de pico 3 veces superior al ruido (línea base). El límite de cuantificación (LC) fue calculado como la concentración experimental de analito que dio una respuesta de la señal 10 veces superior al ruido, aceptándose un coeficiente de variación hasta de 10%. La repetibilidad instrumental fue establecida a través de seis inyecciones consecutivas de una misma solución de muestra a una concentración de 12.5µg/mL con un límite de coeficiente variación (%CV) de 4% según la AOAC [44]. La exactitud fue determinada como el porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito con la que fueron adicionadas tres (por triplicado) muestras a tres niveles de concentración. Para la precisión intermedia se estudió la variación generada por los factores; día de análisis y analista, inyectando en el equipo una muestra preparada 3 veces de forma independiente por 2 analistas diferentes en dos días distintos, siendo aceptados coeficientes de variación 2 veces mayores que para la repetibilidad del método (4%) [45].

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1 Desarrollo del método analítico para la identificación y cuantificación de catequinas presentes en cacaos colombianos

Hasta el momento se han desarrollado una gran cantidad de procedimientos aplicados al análisis de flavonoides presentes en fuentes vegetales, esto refleja la alta complejidad de estas matrices de análisis y la diversidad de escenarios que se pueden presentar en este reto analítico. En ciertos casos, basta conocer el perfil de flavonoides presentes en la muestra con el fin de concluir sobre las variaciones en la composición, en otros casos será necesario aplicar procedimientos que permitan la cuantificación; y cuando se trata de sustancias desconocidas, se requerirá el aislamiento y caracterización estructural [46].

Por lo tanto, el diseño del procedimiento analítico dependerá del interés del análisis. Por ejemplo, en estudios de perfil y cuantificación de flavonoides, la aproximación más útil ha sido la cromatografía, preferiblemente cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) debido a la complejidad de la matriz de análisis, además de la amplia diversidad estructural de los compuestos presentes. Sumado a lo anterior, esta técnica presenta ventajas comparativas con otras metodologías de análisis, como su alta resolución, alta eficiencia, alta reproducibilidad y tiempos de análisis relativamente cortos, así como la posibilidad de evitar someter las

muestras a procesos de derivatización química, dado que no hay restricciones de volatilidad molecular [46].

En la mayoría de los casos, los sistemas reportados para la separación de polifenoles en alimentos involucran la cromatografía en fase reversa, cuya fase estacionaria generalmente son columnas empacadas con sílica modificada C18, con tamaño de partícula medio que oscila entre 3 y 10 μ m. En el presente trabajo, para la estandarización de la metodología analítica y establecimiento del perfil de compuestos presentes en muestras de cacao, se realizaron diversos ensayos en procura de obtener las mejores condiciones cromatográficas.

Inicialmente, se inyectaron muestras preparadas a partir de la extracción de granos de cacao durante 1 hora con una mezcla de acetona-agua (60:40), procedimiento de extracción que fue modificado del propuesto por Niemenak y Col. (2006) [41]. La inyección de estos extractos fue realizada con el objetivo de optimizar la separación de la mayoría de picos presentes en muestras reales, evitando fenómenos de solapamiento de picos o cambios en los tiempos de retención, debidos a la presencia de metabolitos primarios y demás componentes de los granos de cacao que pudieran alterar el comportamiento de los analitos.

En la Figura 3 se observa la evolución del sistema cromatográfico preliminar para el análisis de catequinas del cacao. Esta metodología se usó para establecer los perfiles de compuestos presentes en cacao, de forma que permitiera a futuro

evaluar variaciones en la composición cualitativa de las muestras en análisis. Una vez establecido, el siguiente paso fue la estandarización y optimización de los procedimientos de almacenamiento y tratamiento de las muestras previos al análisis cuantitativo.

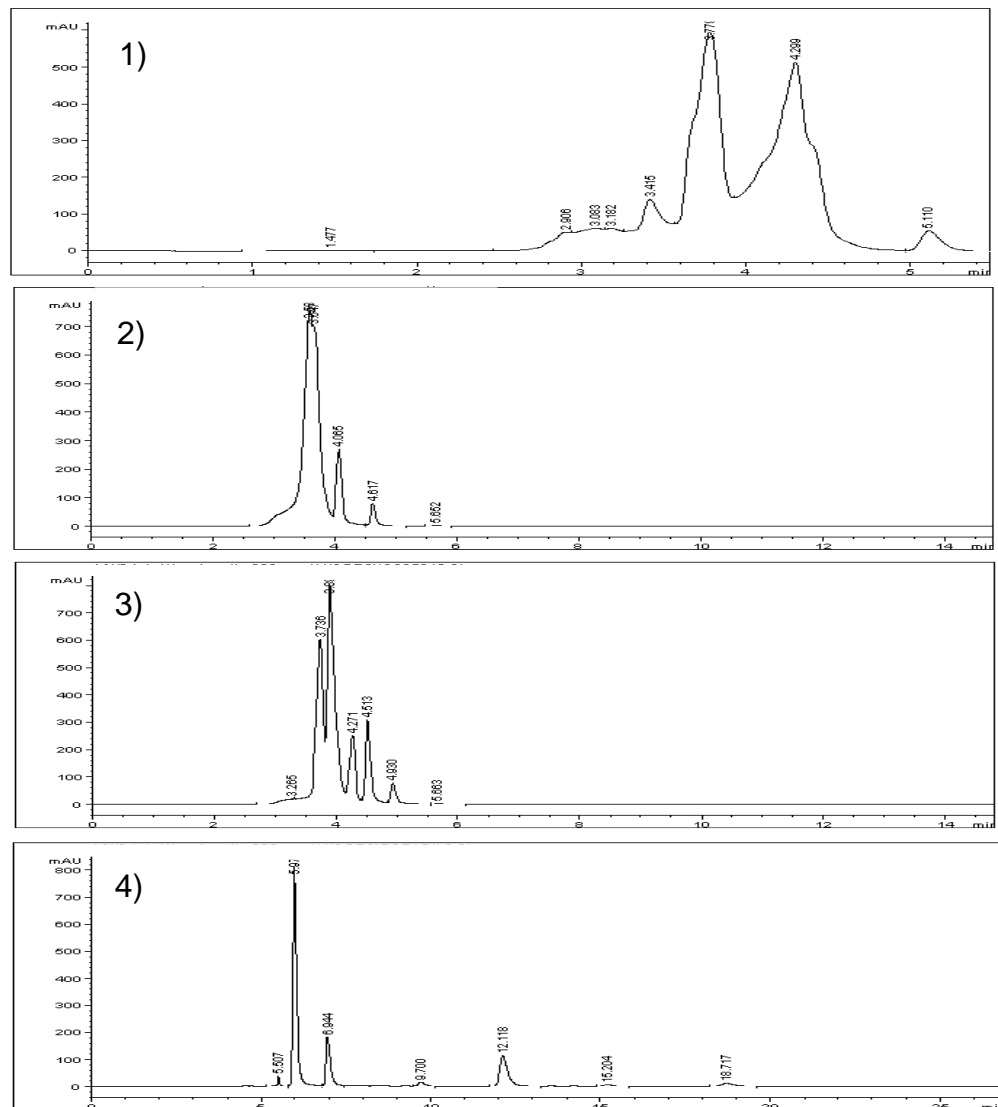


Figura 3. Evolución del desarrollo del sistema cromatográfico para la separación de catequinas del cacao por variaciones en la fase móvil (acetonitrilo (a) y agua con ácido fórmico al 7% (b)). 1) 20%(a) – 80%(b); 2) 70%(a) – 30%(b); 3) 75%(a) – 25%(b); 4) gradiente lineal de 6 a 25%(a) del minuto 0 al 7 y reestabilización de la columna de 25 a 6%(b) del minuto 7 al 18.

Los flavonoides presentan gran inestabilidad, por esta razón, cuando se pretende realizar análisis cuantitativos en muestras que tengan este tipo de compuestos dentro de su composición, es necesario garantizar la estabilidad de los metabolitos durante el almacenamiento y la preparación de las muestras para análisis, ya que técnicamente el análisis simultáneo de las muestras es inviable.

Debido a que para cumplir los objetivos del presente trabajo fue necesario contar con una metodología analítica confiable para la cuantificación de flavonoides en el cacao, específicamente catequinas o flavan-3-oles, y debido a su inestabilidad inherente; se optó por el almacenamiento bajo congelación para mantener la composición cuali/cuantitativa de las muestras, pues si bien al almacenar muestras congeladas de material vegetal no se detienen, si se puede retrasar las reacciones físicas, químicas y bioquímicas que producen su deterioro [47].

No obstante, cuando las muestras para análisis (granos de cacao) son congeladas, existe la posibilidad de observar variaciones en la humedad y por ende en su peso. Lo anterior hizo importante eliminar las variaciones en los resultados, que pudieran darse por diferencias en el peso tomado de cada muestra para análisis.

En la Figura 4, se comparan los perfiles de humedad de muestras de cacao que se almacenaron o no a -20°C . Se verificó que no existieron variaciones significativas en el contenido de humedad de las muestras. Hecho que posibilitó el

almacenamiento de las mismas durante un periodo de tiempo superior a 8 días, sin cambios en la composición de los metabolitos de interés presentes (catequinas y polifenoles en general).

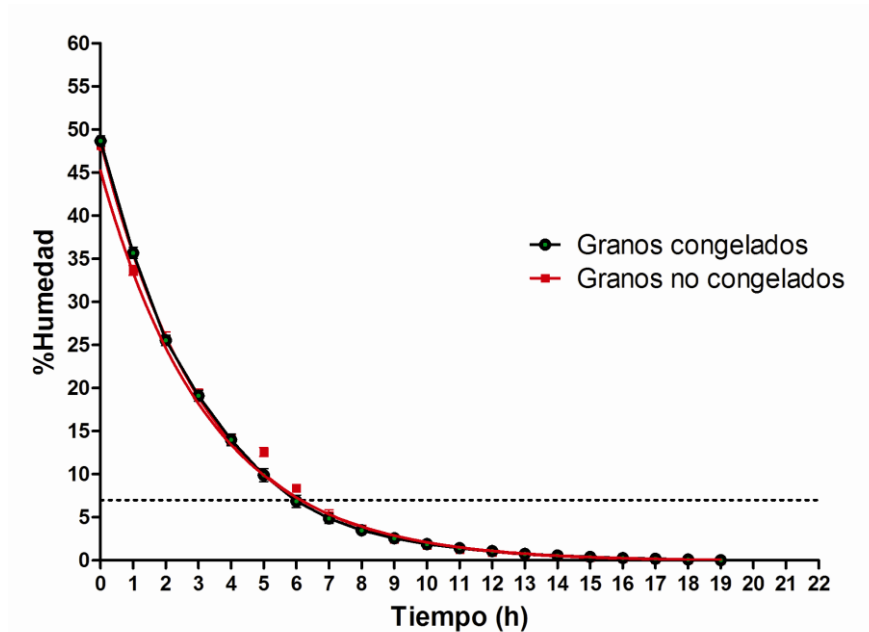


Figura 4. Comparación de los perfiles de humedad de granos de cacao almacenados o no a -20°C .

El desarrollo de métodos analíticos exige que el material sometido al proceso de análisis sea representativo de la población que se pretende someter al análisis, por lo tanto, el primer paso del análisis en la preparación de muestras es la homogenización por medio de la molienda, de manera que permita posteriormente un mejor contacto con el solvente de extracción.

Los métodos tradicionales de extracción sobre matrices vegetales, entre los que se cuentan el Soxhlet, la hidrodestilación y la maceración con mezclas hidroalcohólicas o grasa caliente, basan su principio en la escogencia de un

solvente adecuado y generalmente el uso de calor y/o agitación para incrementar la solubilidad de los compuestos a extraer y la velocidad de transferencia de masa por difusión a través de las paredes celulares [48, 49]. El Soxhlet es una técnica de extracción sólido-líquido que ha sido utilizada durante mucho tiempo. De hecho es una de las metodologías más utilizadas para la extracción de grasas provenientes de especies vegetales, siendo el hexano el solvente de elección para este proceso debido a su estrecho rango de punto de ebullición (63-69°C) y su alta capacidad para solubilizar grasas debido a su baja polaridad [49].

El cacao es un material vegetal rico en grasas. Las grasas presentes en el cacao son conocidas también como manteca de cacao y pueden llegar a representar entre un 50 y 55% del peso total del grano. La manteca de cacao de alta calidad utilizada en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica es obtenida principalmente por métodos mecánicos de presión y extracción con hexano [50]. Las principales desventajas de la extracción con hexano en Soxhlet incluyen grandes cantidades de solvente para extracción, toxicidad del solvente, imposibilidad para agitar la mezcla de extracción mientras se da dicho proceso, y más importante aún, tiempos de extracción extendidos y la posibilidad de descomposición térmica de los compuestos presentes en la muestra, dado que el proceso de extracción usualmente se da en el punto de ebullición del solvente [49]. Debido a lo anterior se evaluó la importancia del desengrase durante el método de preparación de las muestras para análisis, con el fin de disminuir la cantidad de pasos, que puedan generar variaciones en las variables respuesta:

contenido de polifenoles totales y/o el perfil cromatográfico de compuestos presentes en la muestras de cacao.

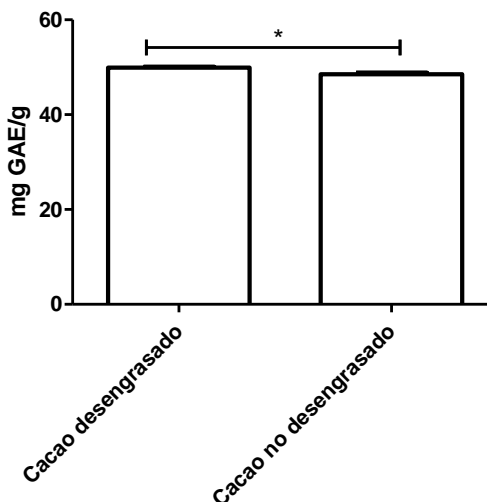


Figura 5. Efecto del proceso de desengrase sobre el contenido de polifenoles totales en muestras de cacao seco.

En la Figura 5, se observa la variación en el contenido de polifenoles totales, cuando las muestras son sometidas o no al proceso de desengrase. Se encontró que el contenido de polifenoles para las muestras desengrasadas y no desengrasadas es de 49.9 ± 0.252 y 48.8 ± 0.473 mg GAE/g respectivamente. El análisis de varianza, reveló que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) debida a este procedimiento, no obstante, dicha diferencia está representada solamente en 1 mg/g de muestra. Estos resultados sumados al perfil cromatográfico obtenido de ambas muestras (Figura 6), en donde se observa que dicho perfil de compuestos no se ve alterado ni en composición ni cantidad de los mismos, hace posible concluir que el proceso de desengrase no es necesario

dentro del método analítico desarrollado, lo que disminuye los gastos en términos de tiempo, energía y solventes.

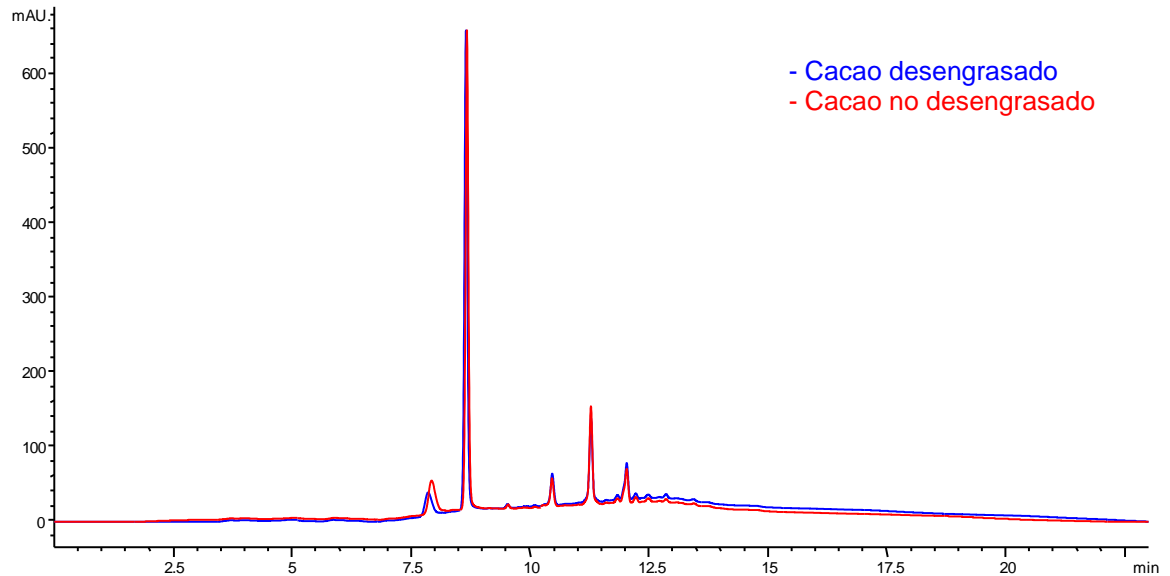


Figura 6. Efecto del desengrase sobre el perfil cromatográfico de las muestras de cacao.

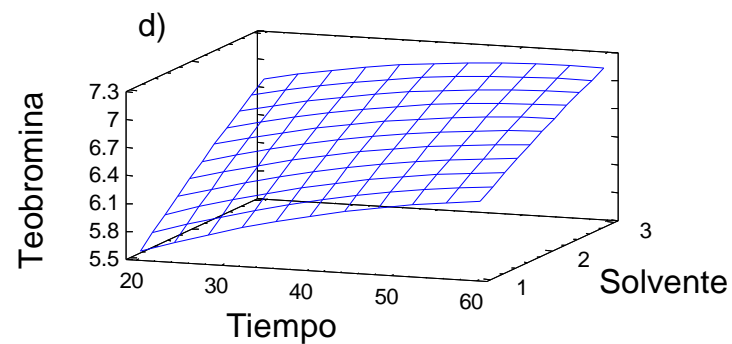
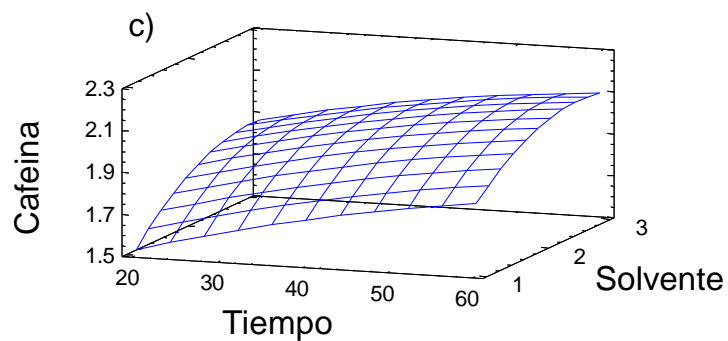
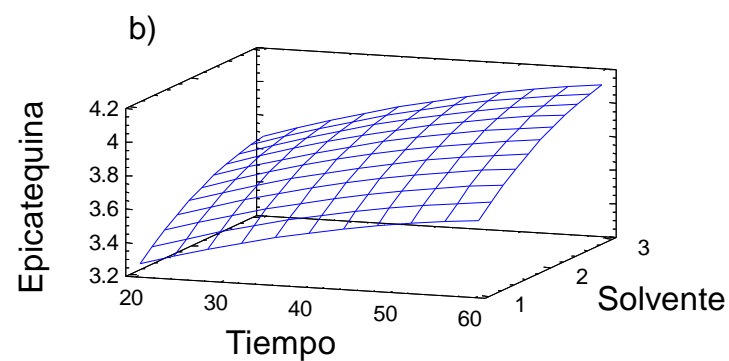
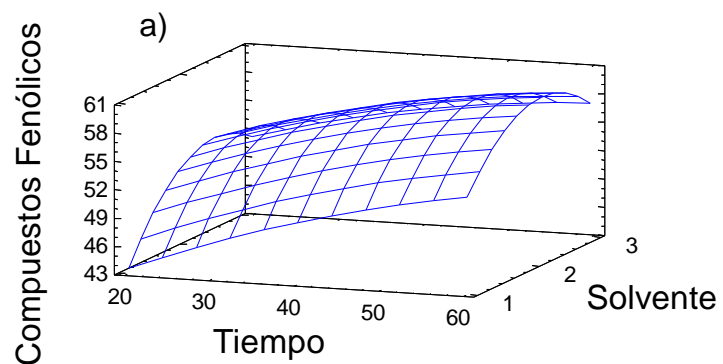
Con los experimentos realizados previamente, se estandarizaron las condiciones requeridas para el almacenamiento y tratamiento de las muestras; sin embargo, se requirió de la optimización del procedimiento de extracción, ya que este es crítico dentro del desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de metabolitos, puesto que de él depende en gran medida la recuperación del material activo deseado, así como la pureza del mismo [51-53].

Para la extracción de polifenoles de cacao se han utilizado soluciones acuosas de metanol y acetona, generalmente entre un 70 y 80%^{V/V}. También se ha utilizado agua y etanol por separado, pero se ha descrito que con estos últimos dos

solventes la extracción es poco eficiente [31]. Dado que con el sistema cromatográfico preliminar se logro observar la presencia de epicatequina, cafeína y teobromina; se buscaron las condiciones óptimas para la extracción simultánea de estos compuestos, teniendo presente que los metabolitos objetivo eran los polifenoles, más específicamente las catequinas. En la Figura 7, se muestran los gráficos de superficie respuesta obtenidos para la extracción de polifenoles totales, epicatequina, cafeína y teobromina presentes en los granos de cacao.

Se encontró que en general la extracción asistida por ultrasonido (EAU) es más eficiente que la extracción convencional por agitación. Se observó además, que el pH básico presenta mayor utilidad para la extracción de los principales compuestos presentes en matrices de cacao, que el tiempo óptimo de extracción es de aproximadamente 60 minutos para todos los metabolitos analizados en este experimento (polifenoles totales y xantinas) y finalmente que la mezcla isopropanol-agua (60:40) es el solvente que permite una mayor extracción de los polifenoles presentes en el cacao.

Figura 7. Gráficos de superficie respuesta para la determinación de las condiciones óptimas de extracción de a) polifenoles totales, b) epicatequina, c) cafeína y d) teobromina. Los datos de a) están expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg GAE/g), y los de b), c) y d) como mg de compuesto por gramo de muestra seca (mg/g). Los solventes 1, 2 y 3 corresponden a las mezclas Acetona-Agua 60:40, Isopropanol-Agua 60:40 y Metanol-Agua 60:40, respectivamente.



En los últimos años se han incrementado esfuerzos en la búsqueda de nuevas técnicas de extracción, tendientes a disminuir o reemplazar totalmente los métodos tradicionales, evitando los inconvenientes que estos presentan, y principalmente intentando mejorar su eficiencia [52, 54, 55]. La extracción asistida por ultrasonido (EAU), es una de las herramientas desarrolladas recientemente para evitar los problemas de los métodos tradicionales. Esta técnica utiliza vibraciones mecánicas en frecuencias superiores al rango audible para el oído humano (1-16kHz), estas frecuencias tan altas crean ciclos de expansión, que a su vez generan presiones negativas y burbujas. Cuando el material por el que viaja la onda sonora es líquido, las burbujas se forman, crecen y finalmente colapsan, dando lugar a un fenómeno de mecánica de fluidos conocido como cavitación [56].

La importancia de este proceso en un procedimiento de extracción, radica en los eventos que ocurren cuando la burbuja colapsa; en algún punto, la burbuja no puede absorber eficientemente la energía del ultrasonido, por lo que implosiona y se genera una rápida compresión adiabática de gases, produciendo temperaturas y presiones extremas, pero debido al tamaño tan pequeño de las burbujas en comparación con el volumen total del líquido, no hay cambios drásticos en las condiciones ambientales del mismo. Además, cuando ocurre el proceso de implosión en presencia de una estructura sólida como el material vegetal, el líquido se expande a altas velocidades ocasionando fuertes impactos sobre la superficie sólida [56], esto incrementa la penetración del solvente en la superficie

del material vegetal y la liberación de los productos intracelulares por rotura de la pared celular [57, 58], lo que posibilita el uso de la extracción asistida por ultrasonido como una herramienta eficaz, para incrementar el rendimiento en la extracción de compuestos biológicamente activos a partir de material vegetal, ofreciendo mayores ventajas que los métodos de extracción convencionales.

La Figura 8a, muestra que los factores principales que afectan significativamente la extracción de polifenoles, son el tiempo y el solvente de extracción, es decir, el rendimiento en su extracción depende principalmente de estas dos variables. Al analizar el diagrama de Pareto para la epicatequina (Figura 8b), es claro que ninguno de los factores principales dentro del diseño experimental, presenta efectos significativos en el proceso de extracción de este metabolito. Debido a lo anterior, para la epicatequina es posible aplicar las condiciones óptimas encontradas para la extracción de polifenoles totales (Tabla 4). Además, dado que el método de extracción utilizado es un factor que tampoco presentó efectos significativos sobre la optimización de la extracción, es posible utilizar cualquiera de las 2 metodologías (extracción convencional por agitación con solventes ó EAU). Dicho lo anterior y gracias a que la EAU permite la preparación de una mayor cantidad de muestras simultáneamente, se decidió implementar esta metodología como la base para la preparación de muestras en los demás ensayos.

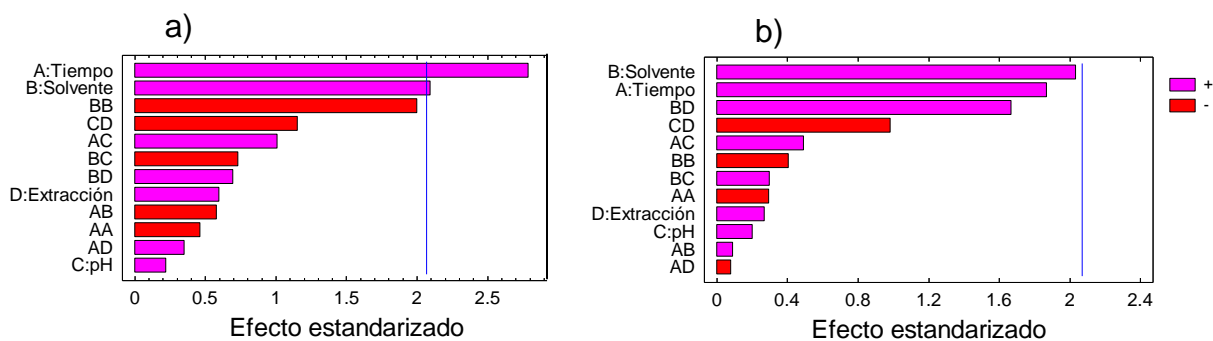


Figura 8. Diagramas de Pareto para la identificación del efecto de las variables de extracción sobre el contenido de a) polifenoles totales y b) Epicatequina en las muestras sometidas a la optimización de la extracción.

Tabla 4. Condiciones optimas para la extracción de polifenoles y xantinas presentes en el cacao.

Variable respuesta	Tiempo (min)	Solvente	pH	Método de Extracción
Polifenoles totales	60	Isopropanol/Agua	9.0	Convencional
Epicatequina	60	Metanol/Agua	9.0	Ultrasonido
Cafeína	60	Metanol/Agua	9.0	Ultrasonido
Teobromina	60	Metanol/Agua	3.0	Ultrasonido

Una vez optimizado el almacenamiento, tratamiento y procedimiento de extracción de las muestras de cacao, fue necesario mejorar la metodología cromatográfica de cuantificación optimizando la separación de los componentes. Para el análisis cuantitativo de catequinas y en general de polifenoles, los principales sistemas solventes utilizados en HPLC analítico incluyen gradientes de elución binarios y ocasionalmente eluciones isocráticas. En ambos modos de elución, esencialmente se han utilizado soluciones acuosas de los ácidos acético, fórmico o fosfórico, con metanol (MeOH) o acetonitrilo (ACN) como modificadores orgánicos [46, 59]. Las características fisicoquímicas de estos últimos dos solventes, como la fuerza y la viscosidad presentan una importante influencia sobre la separación

cromatográfica. Se ha observado que el ACN otorga una mejor resolución permitiendo ver picos más definidos en comparación con el MeOH, sin embargo, este último es preferido debido a su menor toxicidad, mayor disponibilidad y producción sostenible. Es conocido también que el pH y la fuerza iónica de la fase móvil influyen la retención de los analitos en la columna, dependiendo de la ocurrencia de los fenómenos de protonación, disociación o disociación parcial. Un cambio en el pH que incremente la ionización de una muestra, puede reducir su retención en una separación en fase reversa. Así, pequeñas cantidades de ácidos, principalmente ácido acético (2-5%^{V/V}) son incluidas en el solvente para suprimir la ionización de los grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos, dado el carácter ácido de estos, mejorando así la resolución y reproducibilidad de los corridos cromatográficos [46, 59]. Como es de esperarse entonces, el orden de elución de los componentes presentes en una matriz compleja como los extractos de fuentes alimentarias como el cacao, es altamente dependiente de variaciones en el sistema cromatográfico.

En la Figura 9 se observa el sistema cromatográfico previamente mostrado en la Figura 3, con algunas modificaciones realizadas para su optimización, se utilizó una columna Supelco C18 de 25 cm x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil fue una mezcla acetonitrilo (a) y agua con ácido acético al 0.2% (b). El flujo del sistema fue mantenido a 0.75mL/min y se realizó un gradiente lineal de 6 a 25% b del minuto 0 al 7, reestabilizando la columna de 25 a 6% b del minuto 7 al 18. Con esta metodología se logró identificar la presencia de los

compuestos catequina, epicatequina, cafeína y teobromina, por la comparación entre inyecciones de una mezcla de soluciones de los estándares y muestras de cacao. En el cromatograma (a), se puede observar una separación completa de estos picos. Como paso previo al proceso de validación, se verificó experimentalmente la idoneidad del sistema cromatográfico y se encontró que los valores hallados satisfacen los requerimientos generalmente aceptados (Tabla 5).

A pesar de que fue posible la identificación de todos los compuestos y se logró una buena separación de los mismos cuando fueron inyectados los estándares; es importante destacar que cuando se inyectaron las muestras de cacao, se observaron picos deformados cercanos a los tiempos de retención que correspondían para los compuestos cafeína y epicatequina. Se confirmó mediante el método de adición de estándar, que el compuesto adyacente al pico correspondiente a la cafeína era catequina, por su parte el pico adyacente que deformó la señal de la epicatequina no fue identificado. Estos resultados demuestran que a pesar de que los parámetros de idoneidad del sistema se encontraban dentro de los niveles comúnmente aceptados, este sistema cromatográfico presentaba inconvenientes a la hora de realizar la cuantificación de dos de los principales componentes encontrados en las muestras.

Tabla 5. Idoneidad del sistema cromatográfico de separación, utilizando la fase móvil Acetonitrilo-

Ácido acético 0.2%: Agua.

Parámetro de idoneidad	Teobromina (1)	Catequina (2)	Cafeína (3)	Epicatequina (4)
Factor de capacidad (K')	0.854	1.389	1.422	1.581
Factor de selectividad (α)	---	1.626	1.024	1.112
Resolución (R_s)	---	34.947	2.219	11.187
Tiempo de retención (T_r)	8.622±0.002	11.110±0.002	11.260±0.002	12.000±0.001
Asimetría (A_s)	0.953±0.011	1.042±0.001	0.950±0.003	1.025±0.003

Los analitos en la tabla están presentados en orden de retención en la columna de separación.

Los cálculos de α y R_s , se realizaron partiendo del analito final (4) en el siguiente orden:

Epi vs Caf, Caf vs Cat y Cat vs Teo.

Tiempo muerto (T_m): 4.650 ±0.005 min.

Según reportes de la literatura, los criterios para la resolución cromatográfica (R_s) son de algún modo arbitrarios. Para una exactitud cuantitativa razonable, los máximos de los picos deben estar separados al menos 4 desviaciones estándar (4σ). Si es así, entonces $R_s = 1.0$, que corresponde aproximadamente a un 3% de sobreposición (contaminación cruzada) de las áreas de los picos. Un valor de $R_s \geq 1.5$ (para 6σ) representa esencialmente una resolución completa, con sólo 0.2% de sobreposición de las áreas de los picos [60]. Sin embargo, estos criterios solo son válidos cuando las concentraciones de los compuestos adyacentes son aproximadamente iguales. Esto explica el comportamiento de las muestras de cacao cuando son sometidas a este sistema cromatográfico, y dado que es claro que se requiere de una mayor resolución cuando la banda cromatográfica de un componente mayoritario es adyacente a una banda de un constituyente minoritario, se justificó la modificación del método analítico de manera que permitiera la cuantificación de todos los analitos mencionados.

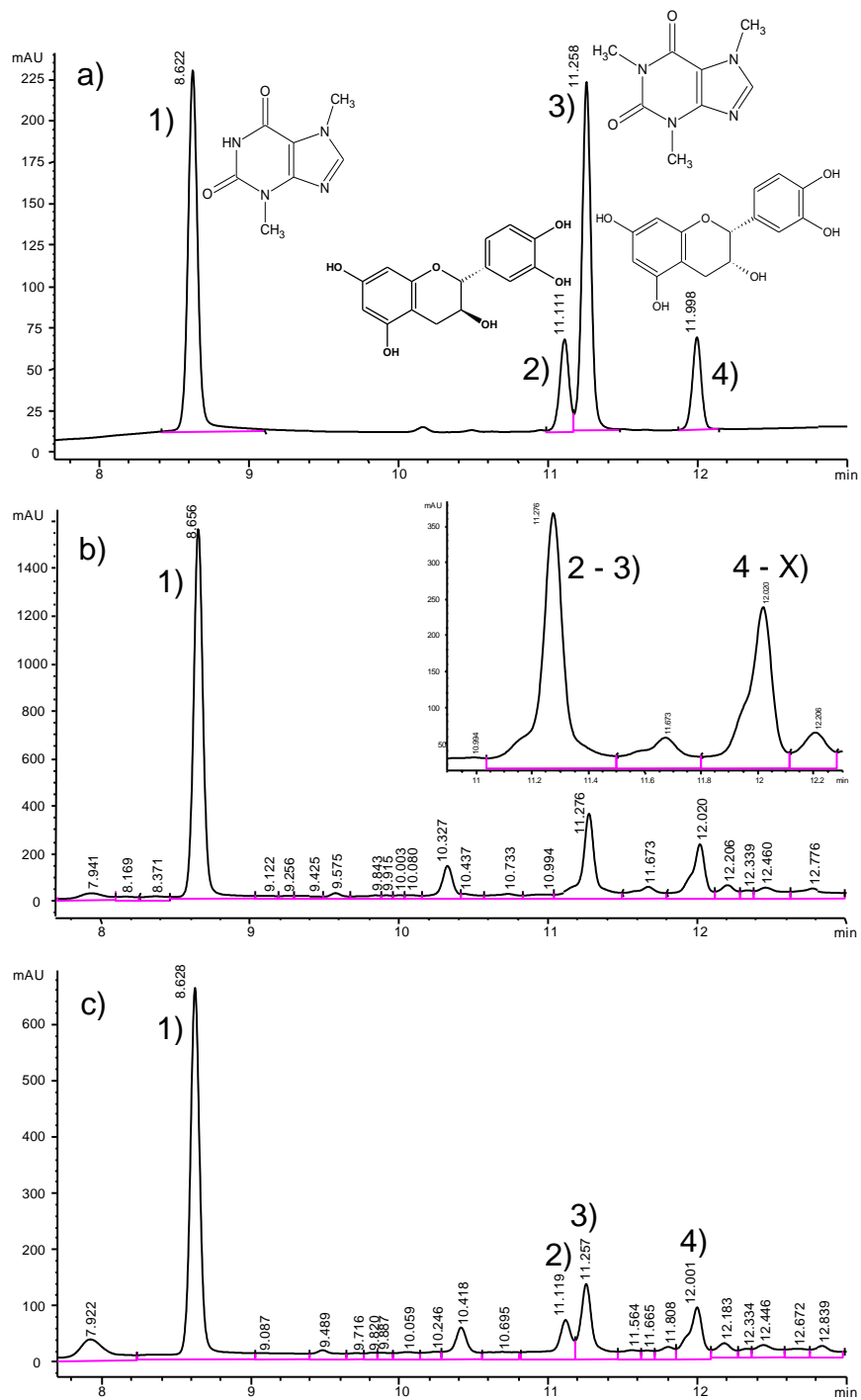


Figura 9. Sistema cromatográfico 1 optimizado. a) Estándares a 25µg/mL. b) Muestra de cacao. c) Muestra de cacao con catequina estándar adicionada. El orden de retención de los analitos en los cromatogramas es 1) Teobromina, 2) Catequina, 3) Cafeína y 4) Epicatequina, X) Compuesto no identificado.

En la Figura 10 se observa el segundo sistema cromatográfico, optimizado para evitar los problemas relacionados con el solapamiento de picos que se presentó en primera instancia. La fase estacionaria fue la misma del primer sistema (columna Supelco C18 de 25cm x 4.6mm, tamaño de partícula de 5µm). Se modificó la fase móvil, cambiando el acetonitrilo por metanol (a) y a la fase acuosa del eluyente se le disminuyó la concentración del modificador de pH (ácido acético) a 0.1% (b). El flujo no sufrió cambios, manteniéndose en 0.75mL/min y el gradiente fue de 6 a 25% b del minuto 0 al 5, siguiendo isocráticamente hasta el minuto 29 y reestabilizando la columna de 25 a 6% b del minuto 30 al 33. A pesar de que el tiempo total de análisis aumentó drásticamente con este sistema cromatográfico, es clara la diferencia en cuanto a la resolución de los picos, y dado que nuestro interés era el desarrollo de un método que permitiera la cuantificación de la mayoría de componentes hallados en las muestras de cacao y no optimizar los tiempos de análisis, usamos este último sistema como el óptimo para realizar los análisis cuantitativos posteriores.

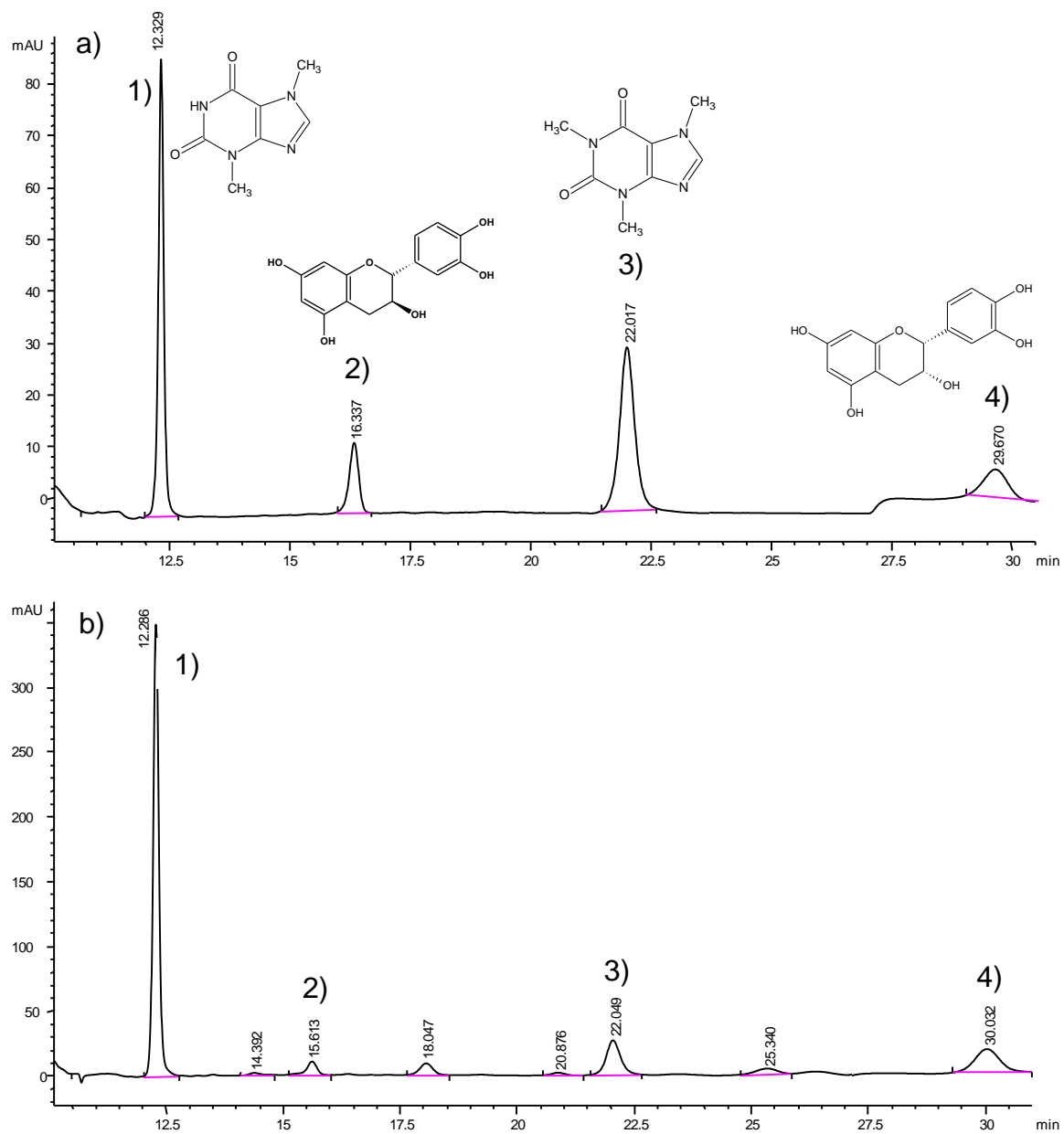


Figura 10. Sistema cromatográfico 2 optimizado. a) Estándares a 25µg/mL. b) Muestra de cacao. El orden de retención de los analitos en ambos cromatogramas es 1) Teobromina, 2) Catequina, 3) Cafeína y 4) Epicatequina.

Nuevamente, como paso previo al proceso de validación se verificó experimentalmente la idoneidad del sistema cromatográfico y se encontró que los valores hallados satisfacen los requerimientos generalmente aceptados (Tabla 6). Con esta metodología se encontró que el orden de elución para los compuestos era el mismo que para el primer sistema, pero hubo un incremento en los tiempos de retención para los analitos teobromina, catequina, cafeína y epicatequina, los cuales fueron de 12.3, 16.3, 22.0 y 29.7 minutos, respectivamente.

Tabla 6. Idoneidad del sistema cromatográfico de separación, utilizando la fase móvil Metanol-Ácido acético 0.1%: Agua.

Parámetro de idoneidad	Teobromina (1)	Catequina (2)	Cafeína (3)	Epicatequina (4)
Factor de capacidad (K')	1.652	2.514	3.735	5.381
Factor de selectividad (α)	---	1.522	1.486	1.441
Resolución (R_s)	---	24.033	20.707	17.803
Tiempo de retención (T_r)	12.330±0.003	16.340±0.002	22.020±0.0006	29.670±0.001
Asimetría (A_s)	0.977±0.007	1.146±0.005	0.948±0.004	0.986±0.016

Los analitos en la tabla están presentados en orden de retención en la columna de separación.

Los cálculos de α y R_s , se realizaron partiendo del analito final (4) en el siguiente orden:

Epi vs Caf, Caf vs Cat y Cat vs Teo.

Tiempo muerto (T_m): 4.650 ±0.005 min.

En cuanto a la validación del método analítico, la proporcionalidad en la respuesta para la catequina, epicatequina, cafeína y teobromina se puede observar en la Figura 11. Se verificó la linealidad en un rango de concentraciones entre 3.1250 y 100µg/mL para la teobromina y de 1.5625-50µg/mL para los demás analitos, disminuyéndose la proporcionalidad por arriba de 50µg/mL para todas las curvas de calibración con excepción de la teobromina.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) encontrados fueron 0.7813 y 1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para catequina, 1.5625 y 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para epicatequina, 0.3906 y 1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cafeína, 0.3906 y 0.7813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para teobromina, respectivamente. Las bajas concentraciones de LC indican que el método presenta sensibilidad para la cuantificación de estos analitos, lo cual es corroborable con las pendientes de las rectas (7.65, 9.63, 29.1 y 28.6 para catequina, epicatequina, cafeína y teobromina respectivamente), revelando que la metodología de cuantificación para cafeína y teobromina, presenta una sensibilidad superior a la cuantificación de las catequinas. Para obtener una mejor exactitud en las curvas de regresión lineal, el límite más bajo de linealidad fue ajustado para ser el LC, de manera que las concentraciones de las muestras de análisis siempre estuvieran en el rango de linealidad. En la Tabla 7, se indican las ecuaciones de las rectas de regresión y los parámetros de validación obtenidos para los cuatro compuestos analizados.

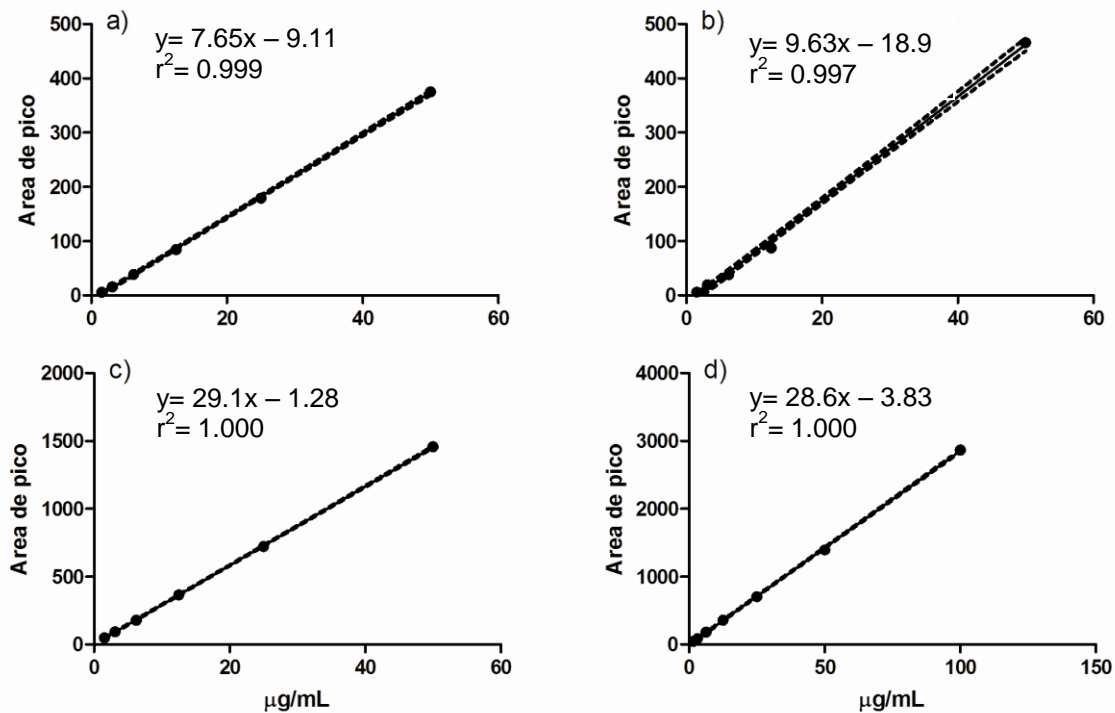


Figura 11. Linealidad y curva de calibración de a) catequina, b) epicatequina, c) cafeína y d) teobromina.

Los resultados obtenidos para la repetibilidad mostraron coeficientes de variación de 1.87, 1.56, 2.21 y 0.70% para catequina, epicatequina, cafeína y teobromina respectivamente (Tabla 7). Estos valores son inferiores a 4%, el cual es normalmente aceptado para la precisión de acuerdo a lo propuesto por la AOAC [44], cuando las concentraciones de analito son inferiores a $100\mu\text{g/mL}$; por lo tanto es posible afirmar que el método presenta una adecuada repetibilidad. La precisión (precisión intermedia) se estudió mediante la variación generada por los factores; día de análisis y analista, inyectando en el equipo una muestra preparada 3 veces de forma independiente por 2 analistas diferentes en dos días distintos,

siendo aceptados coeficientes de variación dos veces mayores que para la repetibilidad del método, según el criterio de aceptación de la AOAC [44]. En la Tabla 7 se reportan los valores de %CV experimentales obtenidos para este parámetro de validación.

Los analitos presentes en plantas se hallan en el interior de su estructura y no de forma aislada como sucede por ejemplo en una forma farmacéutica, por lo que deben ser usados métodos de extracción para retirarlos de su interior. La principal dificultad de la extracción de un analito radica fundamentalmente en las características de la matriz que lo contiene, por lo que a menudo deben aplicarse tratamientos de muestra largos y agresivos que pueden provocar pérdidas de los analitos y por ende causar que los porcentajes de recuperación sean generalmente bajos [45]. Debido a esto, en los estudios de validación de métodos analíticos para la valoración de analitos presentes en plantas medicinales y sus diferentes preparados, o en general en matrices complejas como los alimentos, existen ciertas particularidades en cuanto a los parámetros de validación tenidos en cuenta dentro del estudio. Específicamente, para los estudios de repetibilidad y precisión, los límites de aceptación para los coeficientes de variación son superiores a los considerados como aceptables para los métodos de análisis de materias primas químicamente puras o de sus mezclas [45].

Tabla 7. Parámetros de validación del método de cuantificación.

Analito		Catequina	Epicatequina	Cafeína	Teobromina
Linealidad	Curva de regresión	$y = 7.65x - 9.11$	$y = 9.63x - 18.9$	$y = 29.1x - 1.28$	$y = 28.6x - 3.83$
	r^2	0.999	0.997	1.000	1.000
Rango*		1.5625-50	3.1250-50	1.5625-50	0.7813-100
LD*		0.7813	15.625	0.3906	0.3906
LC*		15.625	31.250	15.625	0.7813
Precisión (%CV)	Repetibilidad	1.87%	1.56%	2.21%	0.70%
	Precisión intermedia	4.72%	3.64%	2.56%	2.60%
Exactitud	%R	92.3-95.5%		88.7-94.1%	

LD: Limite de detección

LC: Limite de cuantificación

r^2 : Coeficiente de correlación

%R: Porcentaje de recuperación

%CV: Coeficiente de variación

*: µg/mL

Por su parte, la exactitud de los métodos analíticos aplicados a plantas o matrices complejas se determina también evaluando los porcentajes de recuperación de los analitos, pero suele realizarse mediante el método de “adición del patrón”, teniendo en cuenta que por la propia naturaleza de la matriz es imposible conocer la cantidad exacta de analito presente en la misma. En nuestro caso, la exactitud fue determinada como el porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito, con la que fueron adicionadas tres (por triplicado) muestras a tres niveles de concentración. Se encontró que el porcentaje de recuperación varió entre 92.3 y 95.5% para los analitos que presentan el núcleo químico “catequina o flavan-3-ol” y entre 88.8 y 94.1% para los analitos que presentan el núcleo químico “xantina”; es posible que los porcentajes de recuperación sean menores para

estos últimos, debido a que el método analítico, desde el proceso de extracción está diseñado para el análisis preferencial de catequinas o en general de polifenoles presentes en el cacao. Se debe notar que en este caso, en el que se utiliza la adición de un patrón puro, los valores resultantes para el cálculo de la recuperación son generalmente bajos, puesto que la recuperación de un analito puro y aislado, resulta ser siempre superior a la recuperación del analito presente en la matriz. Además, debido a los diferentes grados de dificultad que presenta la recuperación de los analitos, en función de la naturaleza de la matriz y de las propias sustancias a extraer, al estudiar la exactitud como porcentaje de recuperación de los mismos, deben considerarse límites de aceptación mucho más amplios que los acordados para los porcentajes de recuperación en especialidades farmacéuticas con principios activos puros [45].

CAPITULO 2

4 IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS CLAVE DE PÉRDIDA DE CATEQUINAS DURANTE LOS PROCESOS DE PRE E INDUSTRIALIZACIÓN DEL CACAO Y OPTIMIZACIÓN LAS VARIABLES IDENTIFICADAS COMO CRÍTICAS

La calidad de los granos de cacao depende de factores como el genotipo, el manejo agronómico del cultivo, el suelo, las condiciones climáticas y más importante aún los procesos de poscosecha [61]. Debido a lo anterior y sumado a la dificultad de estandarizar los procesos de fermentación y secado al sol (preindustrialización) mostrados en la Figura 12, es importante mencionar que actualmente en nuestro país, se están realizando estudios para incrementar el entendimiento de cómo estos procesos afectan la composición fitoquímica de los cacaos colombianos, con el ánimo de mejorar la calidad de nuestros productos y así incrementar la competitividad a nivel internacional [62].

Como se mencionó anteriormente, los cacaos colombianos son catalogados mundialmente como productos de aroma fino; sin embargo, este criterio de calidad incrementa los problemas de los productores y transformadores de cacao para clasificar y estandarizar sus productos. Es un hecho aceptado que se requiere de procedimientos de poscosecha adecuados, para la formación de precursores de “flavor” [34]. Específicamente, durante la fermentación y el secado al sol, los cambios en las concentraciones de metilxantinas y polifenoles, además de las

reacciones enzimáticas y no enzimáticas entre los aminoácidos y carbohidratos simples, son las responsables de la producción del color, sabor y aroma característico y deseable en los chocolates [26, 63]. Durante estos procesos se ha logrado observar una pérdida considerable en el contenido de polifenoles, por lo tanto, es claro que los procesos de poscosecha no solamente determinan la calidad de los productos finales en términos de características organolépticas deseadas, sino también en términos de su posible actividad biológica [64].

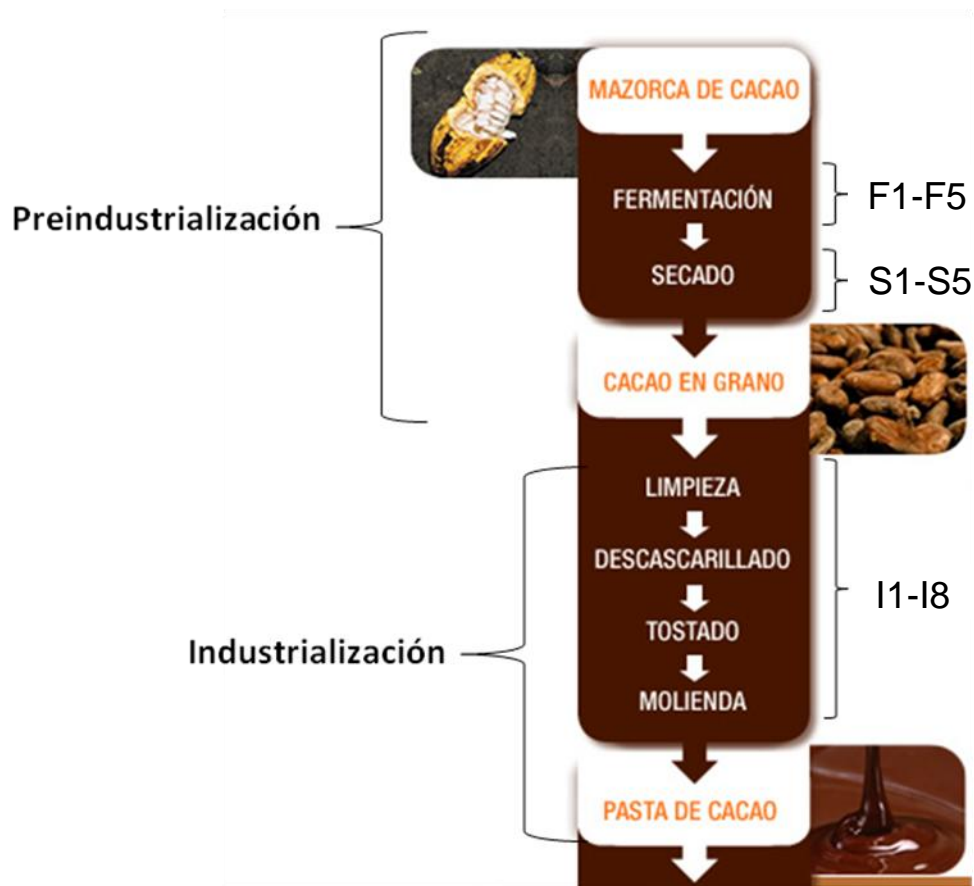


Figura 12. Esquema de los puntos de muestreo en el diagrama general del proceso. Adaptado de Indcre, S.A [65].

Uno de los principales problemas para el análisis de los puntos críticos que llevan a la pérdida de metabolitos en los procesos de poscosecha y transformación del cacao, está relacionado con la alta variabilidad lote a lote de la calidad de los granos. Por ende, para evaluar los cambios en la composición de catequinas y xantinas, su relación con la actividad antioxidante y la actividad polifenol oxidasa (PPO), la cual es una metaloenzima que actúa durante el procesamiento del cacao catalizando dos tipos de reacciones que usan O_2 como agente oxidante: la *orto*-hidroxilación de monofenoles para producir *orto*-difenoles (actividad monofenol monoxigenasa E.C. 1.14.18.1) y la posterior oxidación de *orto*-difenoles a *orto*-quinonas (actividad catecolasa E.C. 1.10.3.1) [66]; se planteó un trabajo que consistió en el rastreo de un mismo lote de cacao seleccionado durante todas las etapas de poscosecha y transformación, con el fin de detectar el efecto puramente del proceso sobre la composición de las muestras.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Muestreo en campo (Preindustrialización)

Se seleccionó la Finca San José en la Vereda Santa Rosa del municipio de San Vicente de Chucurí (Santander), por indicaciones del Departamento de Fomento de la Compañía Nacional de Chocolates, con base en la producción significativa de esta parcela para el chocolate especial o de exportación. Se realizó un

muestreo aleatorizado de granos de cacao en los siguientes 10 puntos (días) del proceso de preindustrialización:

- a) Granos frescos con mucílago (F1)
- b) Granos en el proceso de fermentación (F2-F4): Se tomaron 3 muestras en puntos claramente distinguibles (Donde ocurrieron cambios distinguibles de color, pH, temperatura, etc).
- c) Granos fermentados (F5).
- d) Granos en el proceso de secado (S1-S5).

Se registraron datos de las condiciones de temperatura (máximas y mínimas) y de la evolución de las características organolépticas de los granos durante los días de muestreo en campo. Todas las muestras se almacenaron bajo vacío y se enviaron diariamente a la ciudad de Medellín para su análisis de laboratorio.

Adicionalmente, se muestrearon las 10 áreas de producción que la Compañía Nacional de Chocolates utiliza con más frecuencia como proveedores de cacao para su chocolate de exportación, con el objetivo de evaluar la variabilidad de las diferentes procedencias.

4.1.2 Muestreo en industrialización

Se realizó un rastreo de granos de cacao provenientes de la parcela San José, destinados a ser parte de un lote de producción del chocolate de exportación. Ya en la planta de procesamiento de la Compañía Nacional de Chocolates de Colombia, ubicada en el municipio de Rionegro (Antioquia), se realizó un muestreo aleatorizado de los granos de cacao en los siguientes ocho puntos del proceso:

- a) Salida de la tolva (I1)
- b) Salida del micronizador (I2)
- c) Salida del cascalimpia (I3)
- d) Salida del tornado (I4)
- e) Salida del enfriador (I5)
- f) Salida del premolino (I6)
- g) Salida del molino 1 (I7)
- h) Salida del molino 2 (I8)

Estos puntos de muestreo corresponden a los procesos industriales de limpieza del grano sometido a secado en campo, pretostión, tostión y molienda, hasta la obtención del licor de cacao.

4.1.3 Preparación de las muestras

Las muestras transportadas en bolsas plásticas al vacío, se almacenaron inmediatamente a -20°C después de su arribo a la ciudad de Medellín, hasta su procesamiento. Inicialmente se determinó la pérdida por secado de cada una de las muestras, para permitir la expresión de resultados en base seca. La determinación se realizó según el método oficial AOAC 70.03 [67], por secado en estufa hasta peso constante a 105°C por 6 horas.

Aproximadamente 1.0g de cada muestra (por triplicado) se extrajo con las condiciones óptimas establecidas en el capítulo anterior (15mL de Isopropanol – Agua 60:40^{v/v}, pH 9.0, en un baño ultrasonido por 60 minutos). Posteriormente, las muestras fueron acondicionadas siguiendo la metodología propuesta en la sección 3.1.4. A partir de esta solución, fueron preparadas las diluciones correspondientes para cada análisis, así:

- Contenido de polifenoles totales – Dilución 1/20
- Cuantificación de Catequina – Dilución 1/2
- Cuantificación de Epicatequina – Dilución 1/5
- Cuantificación de Cafeína – Dilución 1/2
- Cuantificación de Teobromina – Dilución 1/5
- Actividad antioxidante por el método ORAC – Dilución 1/100
- Actividad Polifenol Oxidasa (PPO) - Se realizó partiendo de granos en cada estadio del proceso de preindustrialización.

4.1.4 Descripción de los métodos de análisis

4.1.4.1 Contenido de polifenoles totales y cuantificación de catequinas y xantinas

Los métodos de análisis empleados fueron: Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido de polifenoles totales y HPLC para la determinación de catequina, epicatequina, cafeína y teobromina, según se describió previamente en las secciones 3.1.5 y 3.1.6 respectivamente.

4.1.4.2 Determinación de la actividad antioxidante

4.1.4.2.1 Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por el método TBARS

El aislamiento de la LDL se realizó de acuerdo al procedimiento propuesto por Londoño y Col. (2006) [43]. A partir de plasma humano de voluntarios sanos y no fumadores, entre 20 y 25 años de edad, quienes firmaron una forma de consentimiento informado; se obtuvo una fracción de LDL por ultracentrifugación, aplicando un gradiente discontinuo de densidad utilizando un equipo Beckman XL-100. Las muestras de sangre se centrifugaron a 4°C con citrato de sodio como anticoagulante para la obtención de plasma. La fracción de quilomicrones se obtuvo al adicionar una solución concentrada de cloruro de sodio al plasma y centrifugar a 5°C por un periodo de 12 horas a 232303 RCF. La fracción superior fue retirada, se adicionó una solución de bromuro de potasio y se centrifugó nuevamente a 5°C por un periodo de 18 horas a 232303 RCF. La fracción de LDL

obtenida fue cuantificada mediante el ensayo de Bradford [68], empleando el Kit de cuantificación de proteínas marca Fluka.

Una vez aislada y cuantificada, la fracción de LDL se sometió a oxidación. Soluciones de LDL a 500µg/mL se preincubaron durante 15 minutos con soluciones de catequina, epicatequina, cafeína y teobromina en un rango de concentración de 0.625 a 50µM. La oxidación se inició con la adición de una solución de sulfato de cobre (CuSO₄), se incubó nuevamente a 37°C durante 12 horas. Finalizado este tiempo se detuvo la oxidación con la adición de una solución de EDTA.

Para evidenciar la oxidación se determinó la concentración de malondialdehído (MDA), formado como producto principal de la degradación de hidroperóxidos generados por la oxidación de lípidos. A la solución procedente de la oxidación, se le adicionó una mezcla compuesta de ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético y ácido clorhídrico. La mezcla se hizo reaccionar a 90°C durante 30 minutos y posteriormente se midió la absorbancia del cromóforo formado a 532nm [69]. Simultáneamente se realizó un control positivo de la reacción, en el que la LDL se oxidó completamente y un control negativo en el que no sufrió oxidación, es decir se mantuvo en su estado nativo. Finalmente, con los resultados obtenidos se calculó la CE₅₀ (Concentración de los compuestos necesaria para inhibir en un 50% la oxidación de la LDL).

4.1.4.2.2 Determinación del valor ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

El método se basa en la generación de radicales hidrófilos peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) por la descomposición térmica del compuesto diazo AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), estos radicales oxidan el sustrato fluorescente fluoresceína (FL) causando una extinción de su fluorescencia. Por lo tanto, la inhibición de este proceso por un antioxidante es una medida de su capacidad para reducir la producción de $\text{ROO}\cdot$. Este método fue adaptado de un método descrito por Ou, Hampsch-Woodill, y Prior (2001) [70]. Todos los reactivos se prepararon en buffer fosfato 10mM a pH 7,4. Como estándar se utilizó Trolox (un análogo acuoso soluble de vitamina E) en el rango de concentración (0-200 μM). Una mezcla de FL (150 μL de una solución de 1 μM en buffer fosfato) y la muestra (25 μL de una dilución 1/100) se pre-incubó durante 30 min a 37°C, luego se adicionó 25 μL de una solución de AAPH 250mM preparada en buffer fosfato. Se midió la intensidad de fluorescencia cada 2 minutos durante 120 minutos a una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 520nm, respectivamente. La caída en la intensidad de la fluorescencia indica la oxidación de la FL por radicales peroxilo derivados del AAPH. Los resultados de los extractos se compararon con curvas construidas con concentraciones conocidas de trolox. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se calculó el área bajo la curva (AUC) y los resultados se expresaron como micromoles equivalente de trolox (TE) por cada 100g de muestra ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$).

4.1.4.3 Determinación de la actividad Polifenol Oxidasa (PPO)

4.1.4.3.1 Obtención del extracto enzimático

Se partió de aproximadamente 10.0g de granos de cacao que fueron macerados con 40mL de buffer fosfato 0.2M a pH 6.0; suplementado con Triton X-100 (1.5%^{v/v}), PVP (0.5%^{p/v}) y ácido ascórbico 10mM. Posteriormente esta mezcla se licuó y el jugo obtenido se filtró sobre gasa para luego ser centrifugado a 980 RCF durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se sonicó sobre baño de hielo durante 45 minutos, luego de los cuales se centrifugó a 2509 RCF durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se designó como extracto inicial. Finalmente se precipitaron las proteínas usando acetona fría en una proporción de sobrenadante-acetona 1:2, adicionando la acetona lentamente. La proteína precipitada se separó por centrifugación a 980 RCF por 20 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en buffer fosfato 0.2M, pH 6.0. Finalmente, el extracto enzimático se almacenó a -20°C hasta su utilización.

4.1.4.3.2 Evaluación de la actividad enzimática

La actividad PPO se determinó midiendo la velocidad inicial de la formación de orto-quinona a 25°C, indicada por un incremento en la absorbancia a 400nm (espectrofotómetro CaryBio 50 marca Varian), usando catecol 100mM como sustrato. Los resultados se expresaron en unidades de actividad enzimática (U_{PPO}), que se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento en la absorbancia de 0.001 durante un minuto por mililitro de extracto

enzimático [71]. El incremento en la absorbancia fue lineal durante los primeros 60 segundos y se midió en una cubeta que contenía 960 μ L de sustrato (catecol) disuelto en buffer fosfato 0.2M a pH 6.0 y 40 μ L de extracto enzimático. Cada ensayo se realizó por triplicado y como control se tomó 960 μ L de sustrato y 40 μ L de buffer fosfato. Los datos se analizaron en el paquete estadístico GraphPad Prisma 5.

4.1.4.3.3 Caracterización cinética y especificidad de sustrato

El procedimiento anterior se modificó para establecer las constantes cinéticas de la PPO de cacao, utilizando los sustratos naturales de la enzima: catequina y epicatequina. El incremento en la absorbancia fue lineal durante los primeros 60 segundos y se midió en un plato de 96 pozos, donde cada uno contenía 240 μ L de sustrato disuelto en buffer fosfato 0.2M a pH 6.0 y 12 μ L de extracto enzimático. Cada ensayo se realizó por triplicado y como control se tomó 240 μ L de sustrato y 12 μ L de buffer fosfato. La temperatura del medio de reacción fue 25°C y la actividad PPO se determinó por medida de la velocidad de la formación de orto-quinona indicada por un incremento en la absorbancia a 400nm. Ambos sustratos fueron utilizados en un rango de concentraciones de 0.1563 a 5mM.

4.1.4.4 Desarrollo y estandarización de un método cromatográfico quiral para la determinación de enantiómeros de catequinas

Se optimizó la separación cromatográfica quiral de los enantiómeros catequina y epicatequina, además de sus respectivos epímeros dextro y levorotatorios. El método fue desarrollado en un cromatógrafo marca Agilent serie 1200, utilizando el detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 280nm. Como fase estacionaria se usó una columna quiral Lux –Celulose 1 de 50 x 4.6mm, con un tamaño de partícula de 5µm. La fase móvil utilizada fue (a) isopropanol con ácido acético al 0.1% como modificador del pH y (b) hexano; a un flujo de 0.5mL/min y una temperatura de 30°C, el volumen de muestra inyectado fue 1µL.

4.1.5 Optimización de las variables críticas que afectan el contenido de polifenoles y catequinas

4.1.5.1 Metodología de secado

Se realizó un secado controlado a 30, 40 y 50°C utilizando tres sistemas disponibles:

- a) Horno de convección con recirculación de aire
- b) Horno de convección sin recirculación de aire
- c) Horno infrarrojo

Dos muestras independientes de 5.0g de material fueron puestas inmediatamente en cada uno de los hornos a las condiciones especificadas. La cinética de secado se siguió durante un periodo de 15 horas, haciendo mediciones del peso de las

muestras cada tres horas. Se determinó como respuesta óptima, la metodología de secado capaz de disminuir la humedad en menor tiempo.

4.1.5.2 Efecto de la metodología, temperatura y el tiempo de secado sobre el contenido de polifenoles totales

Se usó un diseño factorial generalizado con dos repeticiones. Utilizando muestras de cacao fermentado obtenidas en una de las fincas evaluadas en el punto 4.1.1, se evaluó el efecto de la metodología, la temperatura y el tiempo de secado sobre el contenido de polifenoles totales (Tabla 8). Se realizó una ANOVA de doble vía para evaluar si existieron diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$ (*), altamente significativas $p < 0,01$ (**) y/o fuertemente significativas $p < 0,001$ (***)

Tabla 8. Diseño experimental para evaluar el efecto de las variables de secado sobre el contenido de polifenoles totales.

Factor	Nivel	Respuesta
(A) Temperatura	30°C	%Humedad Contenido de polifenoles totales
	40°C	
	50°C	
(B) Tiempo	3h	
	6h	
	9h	
	12h	
	15h	
(C) Metodología	Horno infrarrojo	
	Horno de convección con aire	
	Horno de convección sin aire	

El diseño experimental se realizó basado en los tiempos de secado efectivo y la máxima temperatura que se alcanza en campo, para simular algunas de las

condiciones de este proceso. Las variables respuesta se evaluaron siguiendo las metodologías propuestas previamente en las secciones 3.1.5 y 4.1.3.

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1 Identificación de los puntos clave de pérdida de catequinas durante los procesos de pre e industrialización del cacao

Con el fin de analizar la variabilidad de los proveedores que eventualmente conformarían los lotes que entrarían al proceso de industrialización, en este estudio se evaluó inicialmente el contenido de polifenoles en granos de cacao que habían sido sometidos previamente a todo el proceso de preindustrialización, cuya procedencia fueran las diez principales parcelas de producción, proveedoras de cacao para la producción de chocolate de exportación (Figura 13).

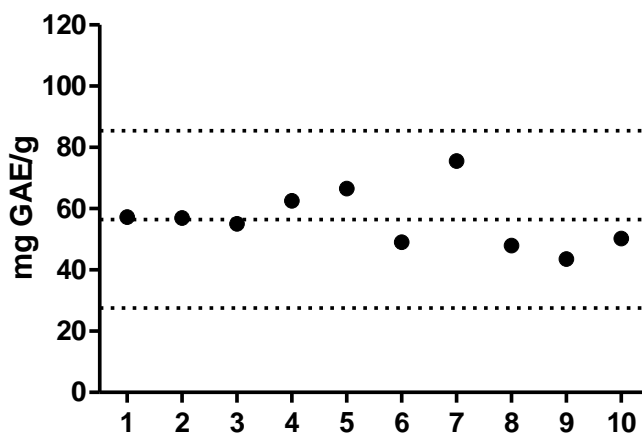


Figura 13. Contenido de polifenoles totales en granos fermentados y secos procedentes de 10 áreas de producción (fincas o parcelas) proveedoras de la marca Santander. 27.52, 56.47 y 85.42mg GAE/g corresponden a los límites inferior, medio y superior respectivamente.

Se encontró que los granos provenientes de estas fincas pueden tener una variación para el contenido de polifenoles entre 43.5 y 75.5mg GAE/g. Estos resultados podrían ser utilizados a nivel industrial como referencia de control para evaluar la calidad de los granos de cacao provenientes de esta región de Colombia. Se constató además, que los cacaos producidos en la Finca San José en la Vereda Santa Rosa del municipio de San Vicente de Chucurí (Santander) se encuentran en la región superior de este rango. Debido a que la producción de esta finca es la que aporta mayor cantidad de materia prima en la elaboración de chocolate fino en la Compañía Nacional de Chocolates, estos resultados justifican su escogencia para la realización de los muestreos en campo.

Los resultados obtenidos en la Figura 14, muestran claramente algunas modificaciones físicas del cacao durante los procesos de preindustrialización. Así, desde el primer día de fermentación se logra ver un cambio de color en los granos, los cuales a medida que pasa el tiempo, modifican su coloración para tomar un tono cada vez más oscuro. Se ha señalado que este fenómeno al parecer se encuentra asociado con la pérdida de polifenoles [28, 31, 72].

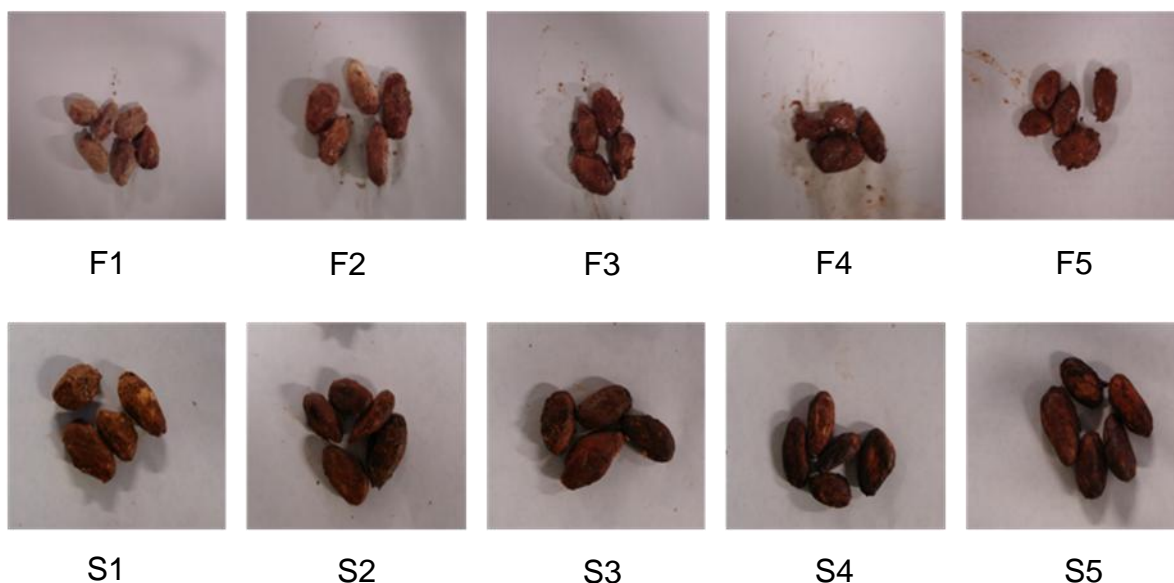


Figura 14. Apariencia externa de los granos de cacao en proceso de preindustrialización. F1-F5) Fermentación, S1-S5) Secado al sol.

Una vez realizados los muestreos y la preparación de las muestras provenientes de todos los estadios de producción, desde la obtención del material fresco, pasando por la fermentación y el secado al sol, hasta llegar a la obtención del licor; se analizaron utilizando los métodos descritos en el capítulo anterior.

En la Figura 15, se muestra como el contenido de metilxantinas y polifenoles es en general alto durante los primeros días del procesamiento de los granos y que gradualmente, se observa una disminución en su concentración a medida que se avanza en el procesamiento. En particular, durante la preindustrialización, la teobromina, compuesto mayoritario presente en los granos de cacao, se redujo cerca de un 25%, (11.2 a 8.3mg/g) al mismo tiempo que la concentración de

cafeína cayó aproximadamente un 14% (2.1 a 1.8mg/g) (Figura 15 e y f), además de aproximadamente un 5 y 15% adicional de pérdida respectivamente, durante la industrialización.

Es necesario resaltar el comportamiento de estas metilxantinas al final de la fermentación, en donde el contenido de ambas aumentó a 12.9 y 2.3mg/g para teobromina y cafeína respectivamente. Este comportamiento ya había sido reportado por otros Brunetto y Col. 2007, en cacaos criollos y forasteros (Tabla 9). Estos autores plantearon que este fenómeno se puede dar debido a que durante la fermentación la testa del cacao se hace permeable a las metilxantinas y dado que estas se encuentran en la pulpa, la cáscara y el interior del grano, es posible que ocurra una migración hacia el interior y debido a esto se observe un incremento en sus concentraciones [61]. A pesar de que no hay cambios bruscos en la concentración de las metilxantinas durante las etapas de procesamiento, si se observa una disminución progresiva y consistente desde el inicio del secado al sol de los granos de cacao, hasta la obtención del licor en la planta de producción de chocolates. Lo anterior concuerda con lo reportado por Nazaruddin y Col. (2006) [63], quienes establecieron que el contenido de metilxantinas no se ve afectado en gran medida por la fermentación, secado o los procedimientos durante la industrialización, observándose un contenido más homogéneo durante estos procesos, a pesar de que existe una tendencia clara a su disminución. Estos autores sugieren que debido a este comportamiento, las metilxantinas no juegan

un papel importante dentro de los cambios fisiológicos que le ocurren a los granos de cacao durante la fermentación.

Tabla 9. Cambios en la concentración de metilxantinas durante la fermentación del cacao.

Modificado de Brunetto y Col. (2007) [61].

	Cacao	Días de fermentación	% Cafeína	% Teobromina
Variedad Criollo	Guasare	0	0.57	0.81
		1	0.53	0.81
		2	0.49	0.78
		3	0.44	0.62
	Zea	0	0.32	0.60
		1	0.39	0.70
		2	0.27	0.56
		3	0.28	0.50
	SJN	0	0.30	0.90
		1	0.41	0.83
		2	0.29	0.85
		3	0.28	0.70
Variedad Forastero	IMC-67	0	0.13	0.88
		2	0.16	0.90
		4	0.10	0.74
		7	0.07	0.65

Por otra parte, se ha reportado ampliamente que el contenido de polifenoles se ve afectado debido a los procesos químicos y bioquímicos, que ocurren durante las etapas del procesamiento del cacao y que este comportamiento se encuentra asociado con la pérdida en la actividad antioxidante [39, 64]. En la Figura 15 (a y d) se muestra una disminución aproximada del 60% (99.9 a 42.4mg GAE/g) y 45% (76037 a 41831 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$) para el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante respectivamente, durante la fermentación y el secado al sol; sumado a un 4.0 y 17.6% adicional de pérdida durante la industrialización. Según Tomas-Barberán y Col.(2007) [73], el contenido de polifenoles totales en cacaos

colombianos es de aproximadamente 81.4 mg GAE por gramo de material seco; al comparar este valor con los resultados obtenidos (Figura 15 a), es claro que el lote de cacao analizado dentro de este trabajo presenta entre un 10 y 20% más polifenoles totales. Haciendo una comparación entre este resultado y aquellos obtenidos por estos mismos autores para cacaos provenientes de diferentes orígenes geográficos (Tabla 10) [73], podemos afirmar que las muestras de cacao evaluadas en este trabajo se encuentran dentro de los principales 3 productores de polifenoles, lo cual sugiere que los cacaos colombianos además de ser catalogados con aroma fino, presentan ventajas comparativas en cuanto al contenido de metabolitos con actividad biológica y por ende podrían ser más útiles dentro de la preparación de alimentos funcionales.

Tabla 10. Contenido de polifenoles totales en granos de cacao no fermentado y secados al sol, provenientes de diferentes orígenes geográficos. Extraído de Tomas-Barberán y Col. (2007) [73].

Origen geográfico	Variiedad	Contenido de polifenoles totales (mg GAE/g de granos secos)
Ecuador	Amazónico-Trinitario-Canelo	84.2±0.87 ^c
Costa de Marfil	Forastero	81.5±18.2 ^b
Colombia	Amazónico	81.4±3.7 ^b
Guinea Ecuatorial	Amazónico Forastero	72.4±9.8 ^c
Venezuela	Trinitario	64.3±5.6 ^d
Perú	Criollo	50 ^e
República Dominicana	Criollo	40 ^e

^bMedia de dos muestras preparadas independientemente. ^cMedia de tres muestras preparadas independientemente. ^dMedia de dos muestras preparadas independientemente ± Desviaciones estándar.

^ePreparación de una muestra. Los resultados son promedios de dos análisis por cada preparación.

Con relación a la actividad antioxidante, los resultados son superiores a lo reportado en la base de datos desarrollada en Estados Unidos, por el servicio de investigación en agricultura, del laboratorio de nutrientes perteneciente al Departamento de Agricultura. En esta base de datos, desde el año 2007 se establece un compendio de valores ORAC para alimentos seleccionados por este organismo. Actualmente está reportado que el valor ORAC para el cacao, y el polvo seco de cacao es 55653 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$, situándose en el vigésimo lugar de los alimentos con mayor actividad antioxidante, dentro de una recopilación de valores ORAC para 326 alimentos [74]. En el presente trabajo, el resultado obtenido para todos los estadios de fermentación fue alrededor de 78855 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ (Figura 15 d), lo cual concuerda con lo previamente establecido por Gu y Col. (2006), para un polvo natural de cacao, es decir cacao sin ningún tipo de procesamiento [39].

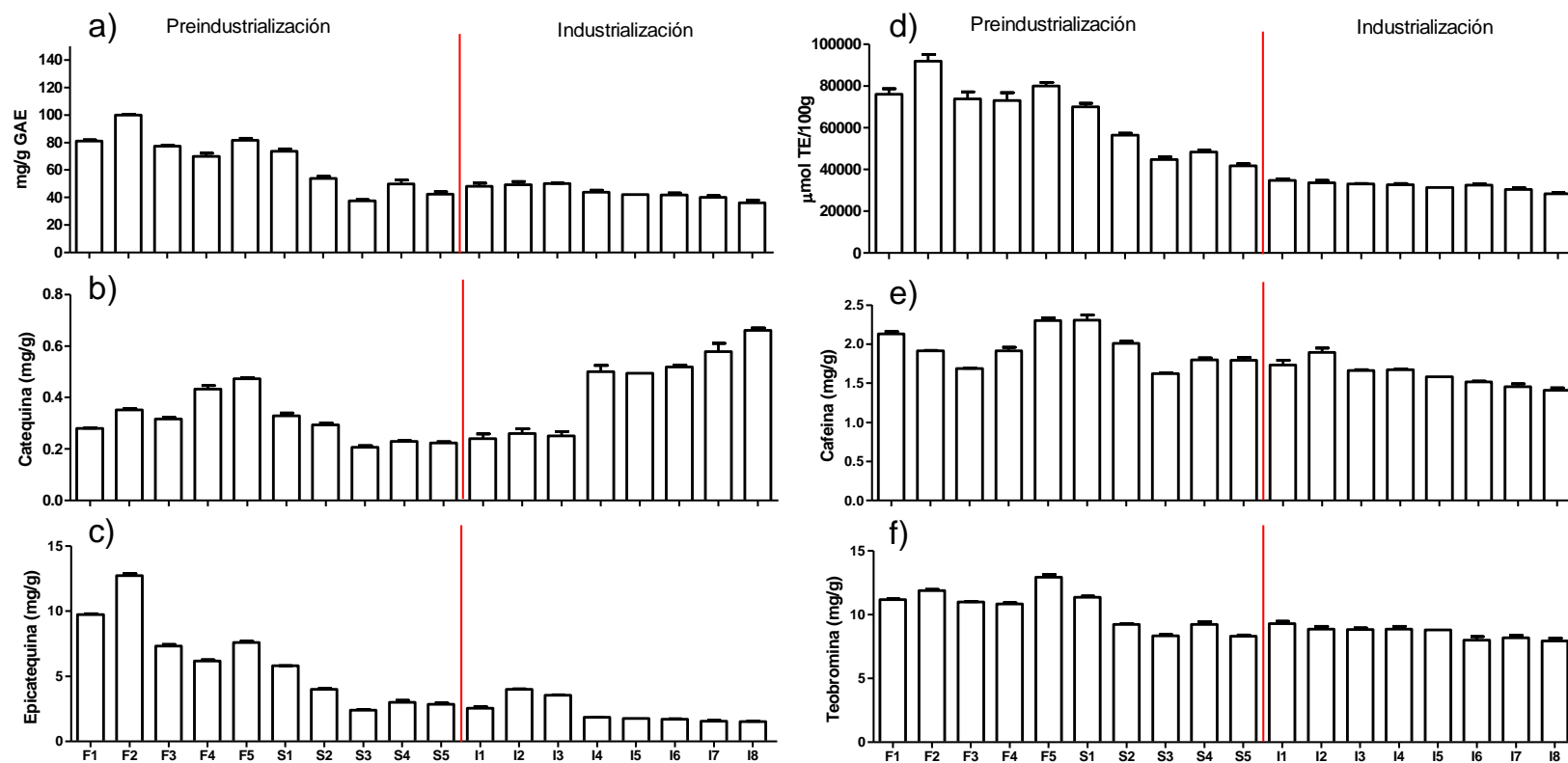


Figura 15. Contenido de a) polifenoles totales, b) catequina, c) Epicatequina, d) Actividad antioxidante por el método ORAC, e) Contenido de Cafeína y f) Contenido de Teobromina en las muestras de cacao o derivados; en los procesos de pre e industrialización. Cada dato es representado como media±DE.

Al analizar la correlación existente entre la actividad antioxidante evaluada por el método ORAC y las variaciones en el contenido de polifenoles durante los procesos de secado y fermentación en la preindustrialización, además de los procesos que comprenden la industrialización, es claro que a medida que aumenta, el contenido de polifenoles, existe un incremento proporcional en la actividad antioxidante de los granos de cacao (o el material en proceso) y viceversa, representado por un coeficiente de correlación de 94.9% (Figura 16a).

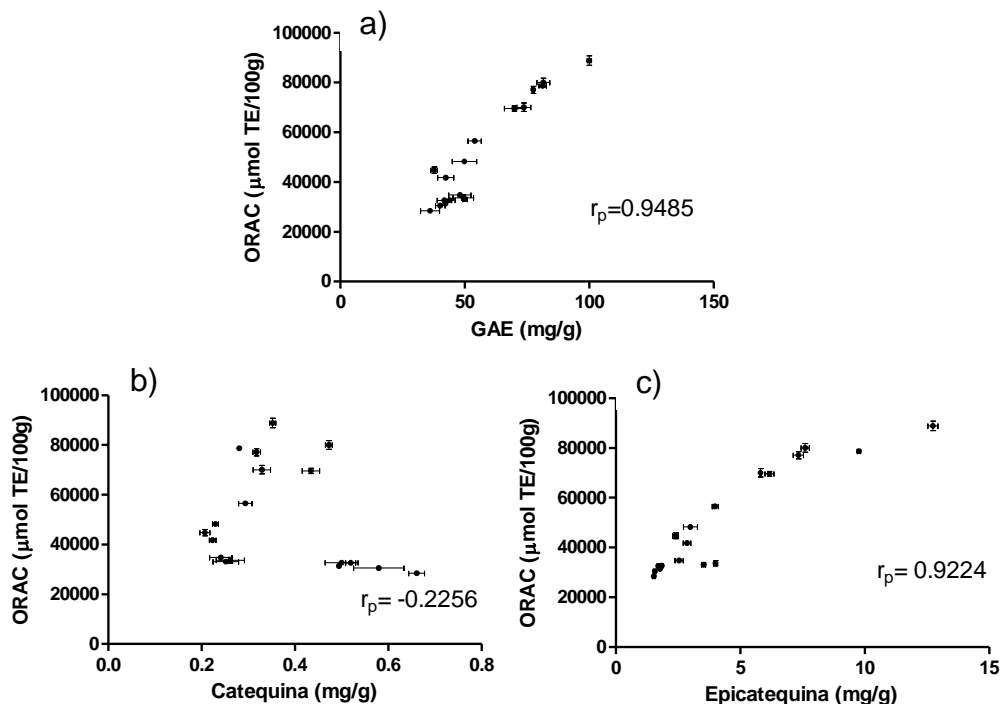


Figura 16. Correlación entre la actividad antioxidante por el método ORAC y a) Contenido de polifenoles totales, b) Contenido de catequina y c) Contenido de epicatequina. r_p : Coeficiente de correlación de Pearson.

El anterior resultado concuerda con lo reportado por Adamson y Col. (1999) [75], quienes plantearon esta misma correlación, entre el contenido de flavonoides en muestras de cacao y chocolate con la actividad antioxidante medida por el mismo método de análisis.

La pérdida de polifenoles durante los procesos de poscosecha se ha asociado comúnmente con la actividad polifenol oxidasa (PPO) [76]. Como se menciono antes, esta es una metaloenzima que actúa durante el procesamiento y senescencia de frutas y vegetales catalizando dos tipos de reacciones que usan O_2 como agente oxidante: la *orto*-hidroxilación de monofenoles para producir *orto*-difenoles (actividad monofenol monoxigenasa E.C. 1.14.18.1) y la posterior oxidación de *orto*-difenoles a *orto*-quinonas (actividad catecolasa E.C. 1.10.3.1) [66]. Las especies químicas producidas luego de estas reacciones, son altamente inestables y pueden reaccionar con grupos amino y tiol de aminoácidos libres y proteínas mediante mecanismos no enzimáticos, o pueden reaccionar covalentemente con otros compuestos fenólicos para formar diferentes pigmentos, ocasionando así el efecto conocido como pardeamiento enzimático [66, 77]. Por lo anterior, se estudió el comportamiento de esta enzima durante el procesamiento del cacao.

En la Figura 17 (a), se muestra como en el periodo comprendido entre el primer día y el final de la fermentación, la actividad PPO disminuyó en un 80%. Para el día 5 del secado al sol, es decir, al final de la preindustrialización, la actividad se

redujo hasta un 94% (3160 a 179.8 UPPO). Hansen y Col. (1998) sugirieron que bajos niveles de actividad enzimática son suficientes para llevar a cabo reacciones oxidativas durante la fermentación aeróbica y posiblemente los primeros días del secado [28]. A pesar de que aparentemente la relación existente entre la pérdida de polifenoles y la actividad PPO es clara, se constató experimentalmente que en realidad existe una correlación de apenas 54% entre estos dos parámetros (Figura 18b), probablemente debido a que no todos los polifenoles presentes en el cacao pueden actuar como sustratos naturales de la enzima.

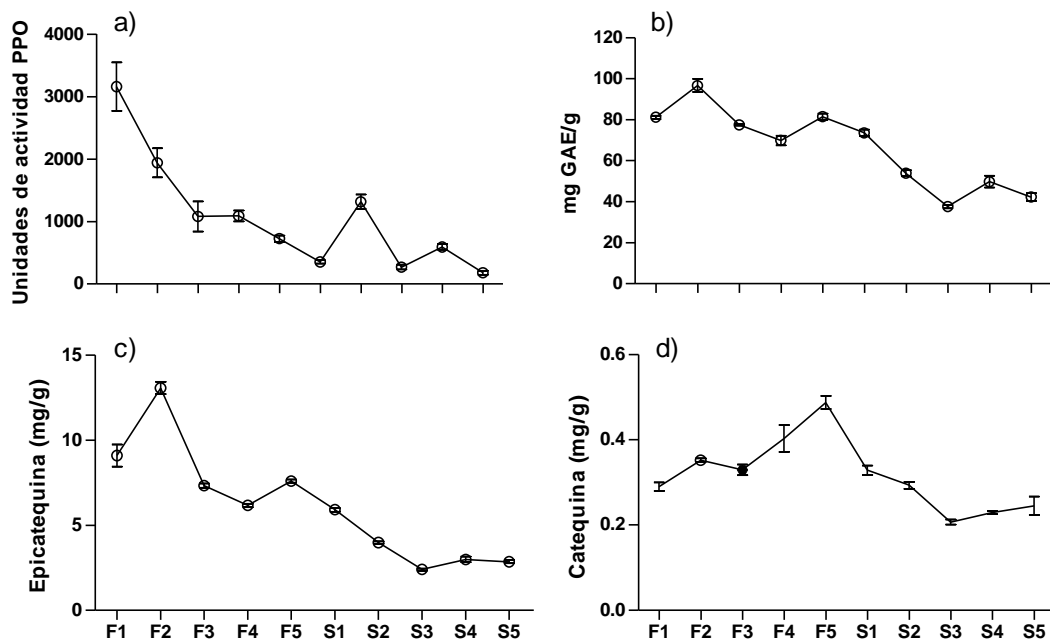


Figura 17. Comparación de la actividad PPO y la variación en el contenido de metabolitos durante las etapas del proceso de preindustrialización. a) Actividad PPO, b) Contenido de polifenoles totales, c) Contenido de epicatequina, d) contenido de catequina. Cada dato es representado como $\text{media} \pm \text{DE}$.

Debido a lo anterior se decidió comprobar el comportamiento de dos moléculas que han sido reportadas como sustratos naturales para esta enzima. En las Figuras 15 y 17, se puede ver el comportamiento de la epicatequina y la catequina, durante el proceso global de procesamiento y la preindustrialización. Se observó una pérdida de epicatequina de 88.2% (12.7 a 1.5mg/g), desde el inicio de la fermentación de los granos hasta la obtención del licor a nivel industrial, que presentó una correlación del 92.2% con la disminución en la actividad antioxidante del cacao, a medida que pasa por todas las etapas de su procesamiento (Figura 16c). Por su parte, la catequina presentó un comportamiento inesperado, debido a que a medida que el contenido de epicatequina disminuyó, su concentración aumentó. Específicamente, durante la fermentación se observó un incremento marcado en la concentración, cercano al 68% (0.29 a 0.49mg/g); posteriormente presentó una disminución hasta 0.24mg/g en la etapa final del secado al sol, y finalmente se logró ver un nuevo incremento durante todos los procedimientos que comprenden la industrialización, siendo acentuado en el material obtenido a la salida del tornado y pudiéndose observar en el producto final, el licor de cacao, un contenido de catequina de 0.66mg/g, representando un aumento en su concentración cercano al 175% (Figuras 15b y 17d), lo cual no correlaciona con la actividad antioxidante durante todos los estadios del procesamiento.

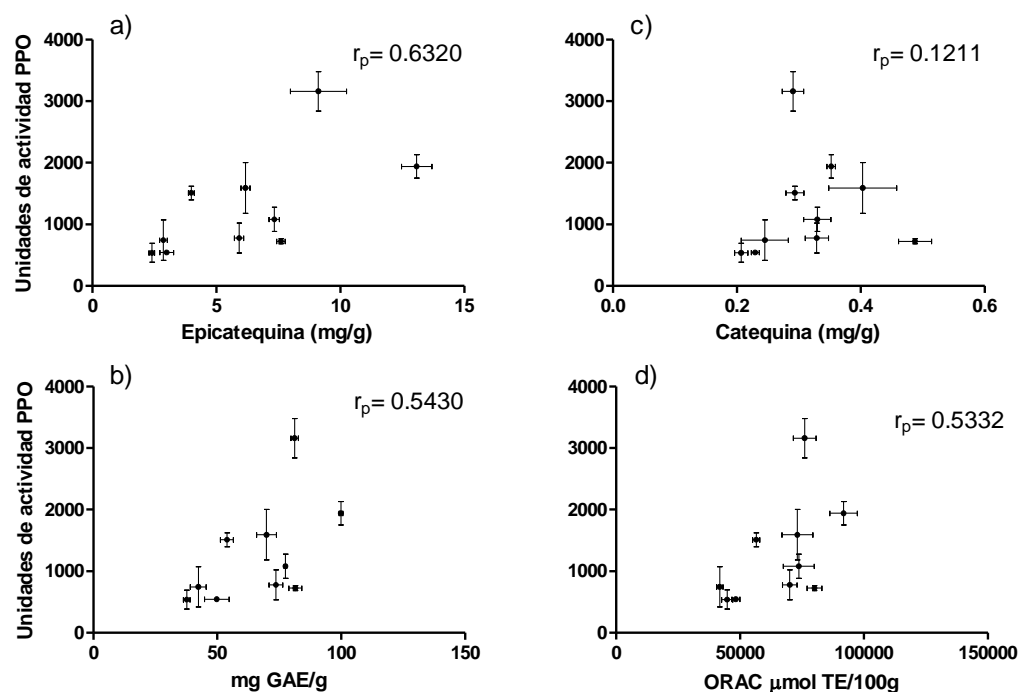


Figura 18. Correlación entre la actividad polifenol oxidasa (PPO) y a) Contenido de Epicatequina, b) Contenido polifenoles totales, c) Contenido de Catequina y d) actividad antioxidante por el método ORAC. r_p : Coeficiente de correlación de Pearson.

Inicialmente se pensó en la posibilidad de que este comportamiento se debía a las variaciones en la actividad PPO. Al realizar los análisis de correlación se encontró que esta actividad enzimática explica un 63% de la pérdida de epicatequina y un 12% de la variación en el contenido de catequina (Figura 18a y c). Gracias a la amplia diferencia en los resultados y dado que ambos compuestos son isómeros, se determinó la afinidad enzima-sustrato con el ánimo de obtener nuevos datos que pudieran explicar el comportamiento de las catequinas en el proceso. La Figura 19 y la Tabla 11, muestran los resultados obtenidos para las constantes

cinéticas de la enzima polifenol oxidasa extraída de los granos de cacao, provenientes de la finca San José. De la gráfica, es claro que el extracto enzimático presenta la capacidad de oxidar ambos sustratos, indicando notoriamente una actividad catecolasa (*o*-difenol oxidasa) [78]. Sin embargo, los resultados muestran que la enzima presenta una mayor reactividad frente a la epicatequina, lo cual está sustentado en una menor K_m , una mayor V_m , y una especificidad de sustrato tres veces superior en comparación con la catequina.

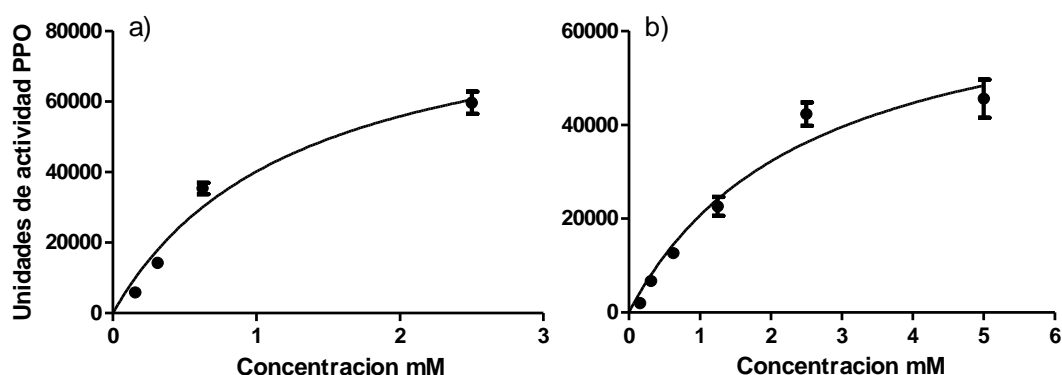


Figura 19. Modelo enzimático de Michaelis-Menten para la determinación de las constantes cinéticas K_m y V_m de la polifenol oxidasa de cacao teniendo como sustratos a) Epicatequina y b) catequina.

Tabla 11. Constantes cinéticas K_m y V_m y especificidad de sustrato para PPO de cacao.

Sustrato	K_m (mM)	V_{max} (UPPO.ml^{-1}.min$^{-1}$)	Especificidad de sustrato (V_{max}/K_m)
Epicatequina	1.282 ± 0.37	91531 ± 12491	71397.0
Catequina	2.522 ± 0.66	72707 ± 9147	28829.1

En un trabajo previo, realizado por Nazaruddin y Col (2006) [63], se mostró el efecto de diferentes tipos de fermentación sobre el contenido de xantinas y compuestos fenólicos, evidenciando un comportamiento de pérdida de epicatequina en mayor proporción que catequina (Figura 20), tal y como lo verificamos en el presente trabajo.

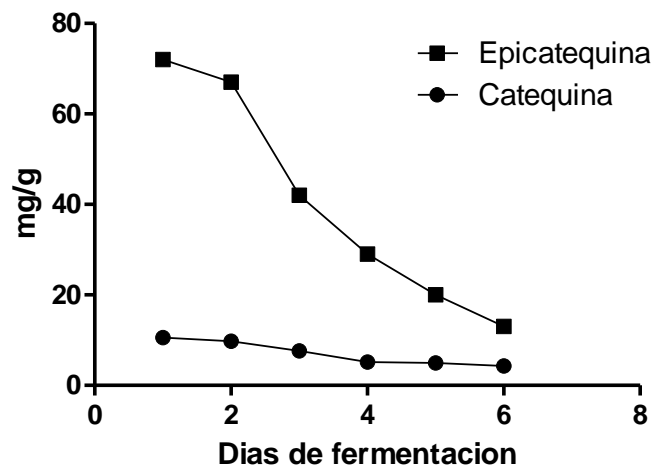


Figura 20. Efecto de diferentes tipos de fermentación sobre el contenido de Catequinas.

Modificado de Nazaruddin y Col. (2006) [63].

A pesar de que estos autores atribuyen las modificaciones en el contenido de catequinas durante la fermentación del cacao, principalmente a procesos de pardeamiento enzimático, seguidas por difusión de estos polifenoles en los exudados de la fermentación; aun no se ha intentado explicar el aumento en la concentración de catequina durante este proceso de poscosecha y para esto, es necesario tener claro hechos importantes planteados por otros autores:

1. La PPO no tiene condiciones adecuadas durante la fermentación debido a los bajos pH que se alcanzan, pero durante el secado al sol, con el aumento en el pH y la alta concentración de oxígeno, las condiciones son apropiadas para la oxidación fenólica (de Brito y Col. 2002) [79].
2. La reducción de los polifenoles durante el secado al sol ha sido atribuida principalmente a pardeamiento enzimático seguido por pardeamiento no enzimático (de Brito y Col. 2002) [79].
3. Las catequinas son propensas a la degradación oxidativa bajo pH alcalino (Nobuyoshi y Col. 2010) [80].

Por lo tanto, es poco probable que la disminución en el contenido de epicatequina al tiempo que aumenta la catequina, sea debida al efecto oxidativo de la enzima PPO, gracias a su poca o nula actividad durante la fermentación y los procesos posteriores dentro de la cadena de producción de chocolates. La pregunta sigue abierta ¿Cómo explicar el comportamiento de las catequinas en la fermentación y los procesos de industrialización?

Se han encontrado evidencias que muestran cómo algunos parámetros (pH, temperatura) relacionados con el procesamiento del cacao y de otros productos ricos en catequinas, podrían contribuir a un fenómeno de epimerización. De hecho, se sabe que los epímeros de las catequinas del té son convertidos en sus isómeros bajo condiciones especiales, tales como alta temperatura y largos periodos de almacenamiento [81, 82]. En el año 1997, Seto y Col. [83]

desarrollaron un método para epimerizar las catequinas del té verde bajo condiciones de pH débilmente ácidas. De acuerdo a lo planteado por Tagro y Col. (2010) [84], durante la fermentación del cacao, los granos pueden alcanzar pH entre 4.7 y 5.0, esto sumado a temperaturas entre 45 y 50°C conseguidas durante este proceso [31], hace plausible proponer que es posible que el fenómeno de epimerización ocurra durante la fermentación, pues los resultados presentados sugieren que la actividad PPO puede no ser el único factor que explique los cambios en la composición del cacao durante la poscosecha.

Brevemente, el proceso de epimerización consiste en la alteración en la conformación espacial de un compuesto para convertirse en su epímero. Específicamente, las catequinas simples (catequina y epicatequina) son dos isómeros, que a su vez pueden tener cada una de ellas dos epímeros (+ y -), de acuerdo con las estructuras que se muestran en la Figura 21.

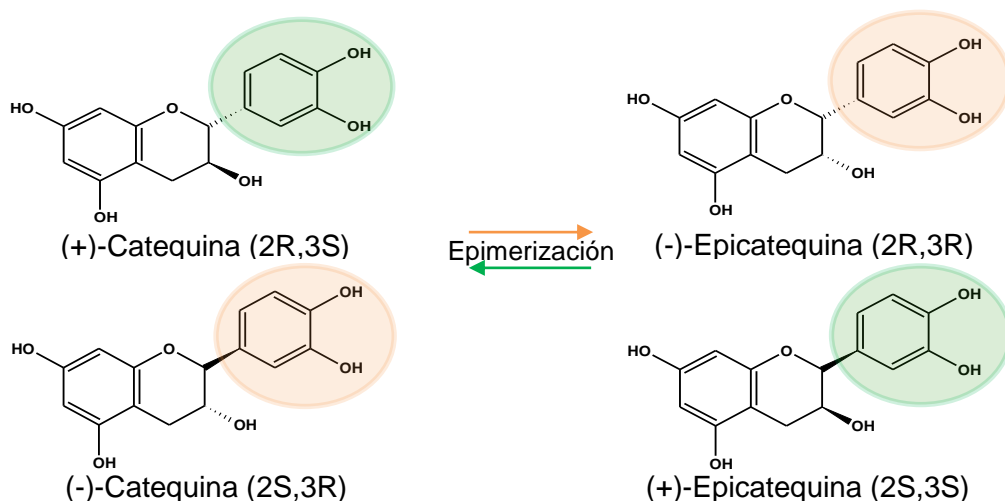


Figura 21. Estructuras químicas de las principales catequinas en cacao y sus respectivos enantiómeros.

Se conoce que durante la biosíntesis, la catequina y epicatequina se sintetizan principalmente como (+)-catequina y (-)-epicatequina, y que las formas atípicas (-)-catequina y (+)-epicatequina están presentes muy raramente en la naturaleza y su presencia se debe a una acción enzimática o condiciones del medio que favorecen la reacción [85].

Kofink y col. (2007) [86], en un estudio que pretendía evidenciar el efecto de los tratamientos industriales sobre la epimerización de catequinas en cacao, lograron demostrar que los granos no fermentados, secos, pero no tostados, contienen principalmente (+)-catequina y (-)-epicatequina; adicionalmente, en granos de cacao tostado también encontraron (-)-catequina, lo cual atribuyeron a los procesos térmicos que contribuyen a la conversión de (-)-epicatequina a (-)-catequina. Por su parte Payne y Col. (2010) [87], encontraron resultados similares cuando sometieron granos de cacao no fermentados a un proceso de tostión a 120°C, hallando un incremento en el contenido de catequina del 696%. Estos resultados son similares a los hallados dentro de este trabajo en relación al proceso de industrialización del cacao, ya que se encontró el mismo patrón de comportamiento para estos metabolitos durante esta etapa de la cadena de producción de chocolates, sin embargo, aún no es posible explicar el incremento en el contenido de catequina durante la fermentación.

Hay que destacar que resultaría de gran importancia el control de este fenómeno durante todas las etapas de los procesos de pre e industrialización, de manera

que permitiera la obtención selectiva y abundante de algunos epímeros, debido a que se ha establecido que la estereoquímica juega un papel determinante sobre las propiedades biológicas, farmacológicas y toxicológicas de muchos nutrientes (D-glucosa, L-amino ácidos, L-ácido ascórbico, tocoferoles) [88], incluyendo los posibles efectos biológicos de los flavonoides dietarios como los presentes en el cacao.

Lo anterior se evidencia en los resultados obtenidos por Lotito y Col. (2000) [89], quienes hallaron para la catequina y epicatequina concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) sobre la oxidación de lípidos plasmáticos de 32.3 y 28.1 μM, respectivamente. Donovan y Col. (2006), encontraron también una alta concentración de (-)-catequina en comparación con (+)-catequina en muestras de chocolate y además establecieron que la biodisponibilidad del enantiómero levógiro es menor al dextrógiro [90], lo que resulta en bajas concentraciones plasmáticas de (-)-catequina y posiblemente un menor efecto benéfico sobre la salud cuando se consumen chocolates. El reporte más reciente realizado por Ottaviani y col. (2011) [88], confirma que la configuración estereoquímica de los flavanoles, tiene una profunda influencia sobre su metabolismo en humanos y que los efectos benéficos sobre la salud asociados con el consumo de alimentos ricos en flavanoles, dependen significativamente de la configuración estereoquímica de los compuestos ingeridos; siendo la (-)-epicatequina el estereoisómero simple con mejores resultados sobre la salud cardiovascular, pues presenta la mayor capacidad de dilatación arterial.

En la Figura 22, se puede observar la curva dosis-respuesta obtenida para los compuestos catequina y epicatequina analizados como inhibidores de la peroxidación lipídica de lipoproteínas de baja densidad (LDL); donde se encontró el mismo patrón de comportamiento hallado por Lotito y Col. (2000) [89], aunque, las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) fueron menores a las reportadas previamente por estos autores (4.73 y 6.95 μM para epicatequina y catequina respectivamente).

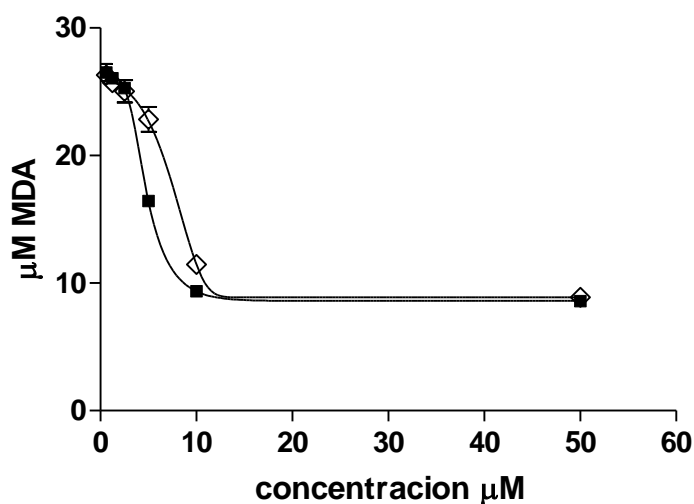


Figura 22. Efecto de las catequinas Epicatequina (■) y Catequina (◇) sobre la inhibición de la peroxidación lipídica de la LDL.

Los resultados anteriores, junto con el incremento en las concentraciones de catequina durante la fermentación en la preindustrialización y los procesos de industrialización, además de que el método de análisis utilizado hasta el momento (HPLC con columna C18) sólo permite la separación de los isómeros (catequina y epicatequina), pero no de los epímeros (+ y -), dejaron clara la necesidad de

comprobar la hipótesis de la epimerización de (-)-epicatequina a (-)-catequina durante estos procesos. En las Figuras 23 y 24, se muestra el desarrollo de un método cromatográfico quiral para la separación y análisis de los isómeros catequina y epicatequina, además de sus respectivos enantiómeros dextro y levorotatorios, para ser adaptado a la determinación de estos metabolitos en los procesos de pre e industrialización del cacao.

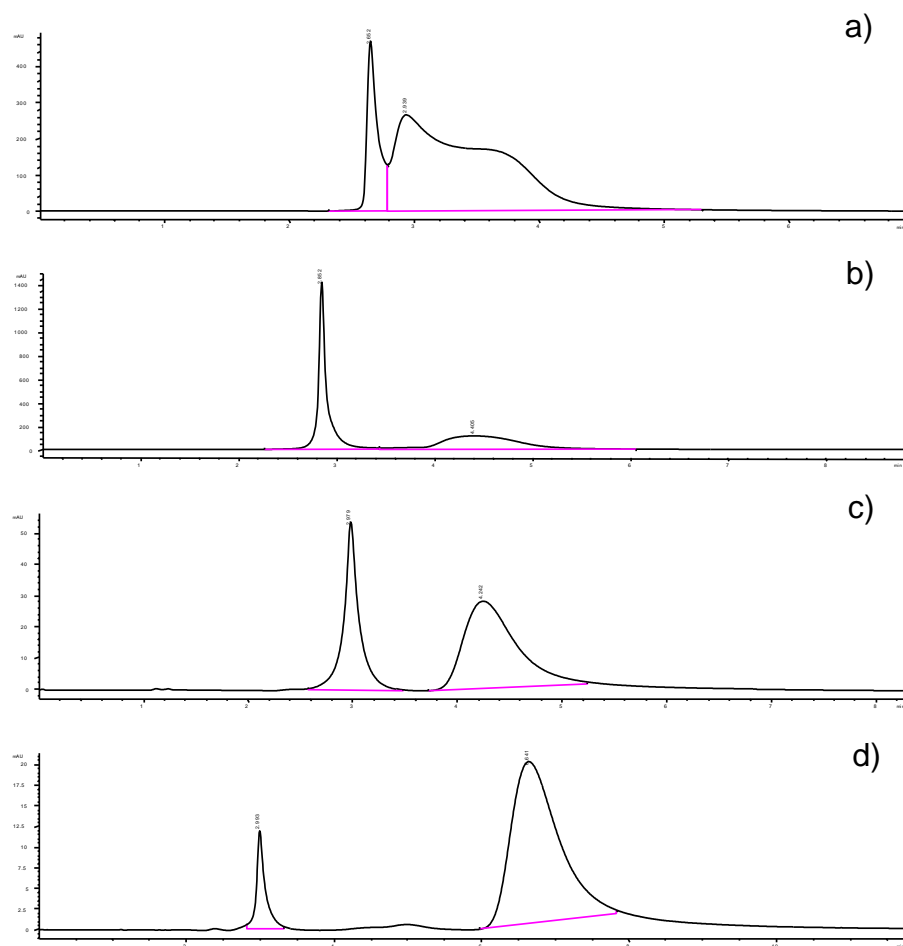


Figura 23. Desarrollo del sistema cromatográfico quiral para la separación de los epímeros de catequina y epicatequina presentes en las muestras de cacao provenientes de los procesos de pre e industrialización. a), b), c) Inyección de catequina 50mg/mL para la optimización de la separación, d) inyección de epicatequina a la misma concentración.

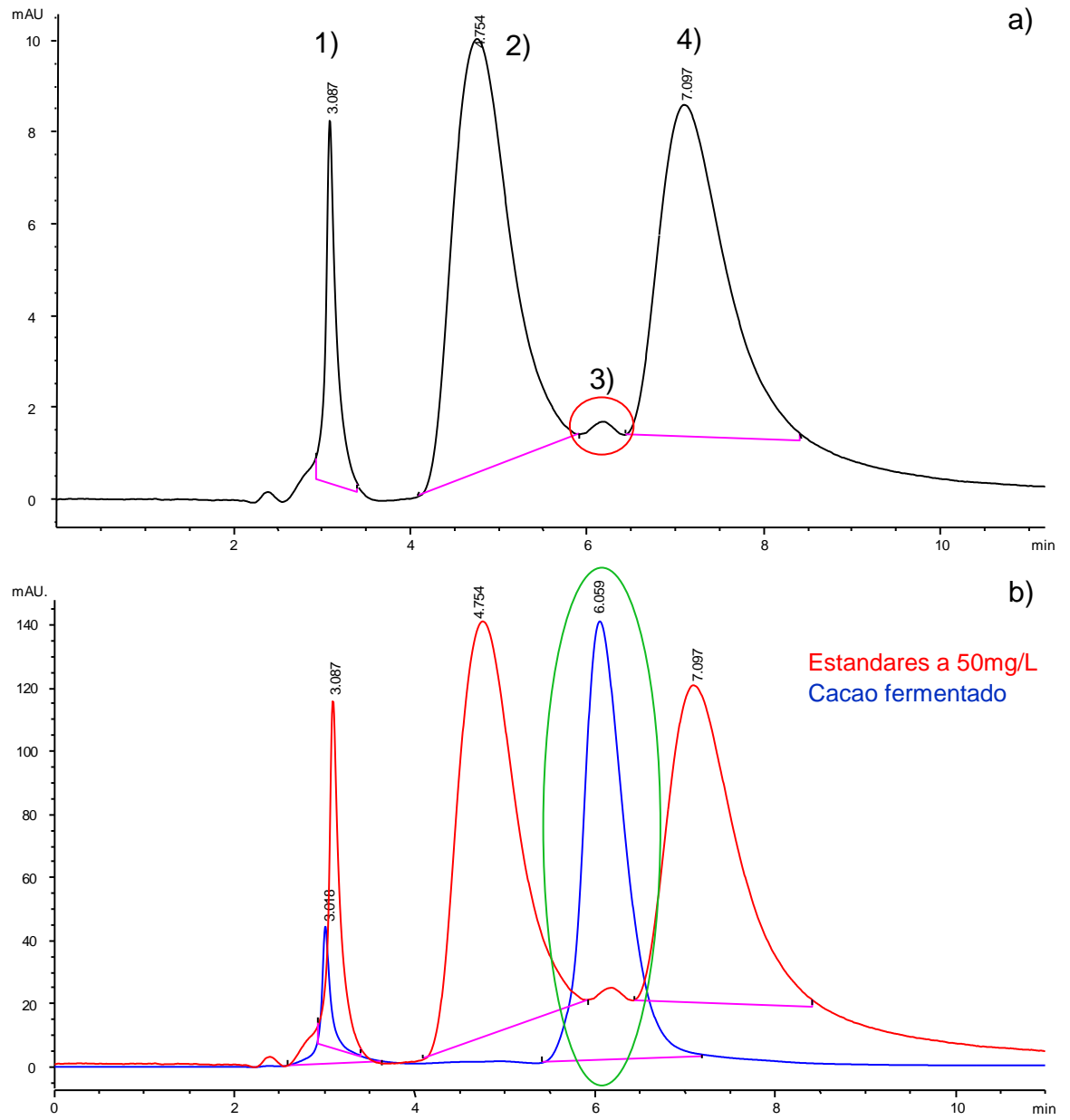


Figura 24. Comparación de tiempos de retención entre a) una mezcla de estándares (catequina y epicatequina a 50mg/L) y b) una muestra de granos de cacao fermentado.

Aunque no fue posible la identificación inequívoca de los 4 picos presentes en el cromatograma, al analizar las Figuras 23 y 24, es claro que los picos 1-2 y 1-4 corresponden a la inyección de los estándares no quirales de catequina y epicatequina, respectivamente. Al realizar un estudio de los cromatogramas obtenidos con la columna quiral para muestras provenientes de diferentes puntos en la cadena de producción de chocolates, se observa claramente que a medida que el pico con tiempo de retención de 3.04min disminuye, aumenta el área del pico a 5.40min (Figura 25). Nuevamente, este resultado concuerda con lo reportado en cuanto a la pérdida de (-)-epicatequina y el aumento en la concentración de (-)-catequina, pero probablemente debido a los problemas inherentes al trabajo con columnas quirales como su alta saturación, no se logró ver la presencia de los demás picos buscados. El anterior hecho no posibilita dar una conclusión acerca de la hipótesis de que las catequinas también sufren un proceso de epimerización durante la fermentación; y por lo tanto queda abierta esta cuestión para futuras investigaciones.

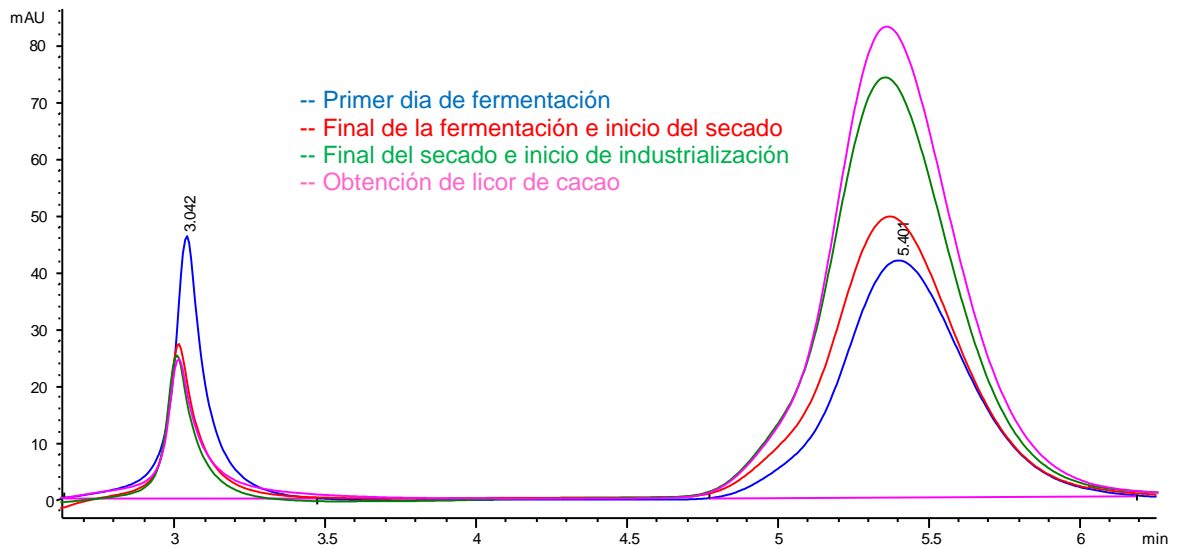


Figura 25. Variaciones en las áreas de pico observados para los extractos provenientes del primer día de fermentación, final de la fermentación e inicio del secado, final del secado e inicio de la industrialización y obtención del licor de cacao.

4.2.2 Optimización de las variables identificadas como críticas en el procesamiento del cacao, para la obtención de productos con alto contenido de polifenoles.

Una vez se logró identificar que dentro de la cadena de producción de chocolates los puntos más relevantes en cuanto a la pérdida de polifenoles son los procesos de preindustrialización (fermentación y secado al sol), se buscaron alternativas para la obtención de productos con alto contenido de polifenoles desde estas etapas del procesamiento.

Debido a que el proceso de fermentación involucra variables que no son posibles de optimizar dentro de este trabajo, como la caracterización del tipo de microorganismos responsables del proceso y/o los tiempos de incubación; la optimización se centró en el secado, utilizando dos enfoques básicos, el secado por convección con aire caliente, en donde la muestra se somete a una corriente positiva de gas caliente que tiene como objetivo transportar el calor para secar el material y a la vez servir de medio para eliminar el vapor de agua; y el secado con fuente infrarroja, que aunque no es una técnica convencional, ha visto incrementado su uso en los últimos años debido a las características propias de su mecanismo de secado, el cual comparado con los métodos convencionales resulta más eficiente, puesto que se omite la etapa lenta de transferencia de calor desde la superficie al interior del material a secar, ya que con el secado por infrarrojo el material se calienta como un todo y el proceso sucede de manera casi instantánea, lo cual es sin duda una ventaja [91].

En la Figura 26, se presentan los valores medios de humedad de los granos de cacao a lo largo del tiempo, en los procesos de deshidratación por 3 metodologías (horno de convección con recirculación de aire, horno de convección sin recirculación de aire y horno infrarrojo) a temperaturas de 30, 40 y 50°C. Durante las primeras 3 horas del proceso, se observó una ligera disminución de la humedad de los granos a una temperatura de 30°C, pero muy significativa a 40 y 50°C con las tres metodologías. Se constató además que luego de 3 horas, la pérdida de humedad de los granos es mucho más moderada (menor pendiente).

Lo anterior se explica por la facilidad de arrastre que tiene el proceso de secado, debido a la presencia de agua libre en la superficie del sólido, la cual está suficientemente saturada y por lo tanto pasa directamente de la superficie al aire de arrastre antes de que se cumplan las 3 horas de secado, lo cual genera una fuerte caída de la humedad del sólido; luego, es moderada porque el agua primero tiene que pasar del interior hacia la superficie por mecanismos de difusión [92]. Este mecanismo es propio de materiales altamente porosos [93].

El horno infrarrojo fue más eficiente en el proceso de secado (Figura 26), ya que luego de 15 horas a las 3 temperaturas establecidas, condujo a porcentajes de humedad menores en comparación con las otras dos metodologías de secado, llegando a un mínimo de 6.8% de humedad cuando el secado se realizó a una temperatura de 50°C. A pesar de lo anterior, de acuerdo a los datos obtenidos, los cuales siguen un modelo matemático de decaimiento exponencial de una sola fase (Ecuación 1) y según los parámetros cinéticos hallados (Tabla 12), el horno de convección con recirculación de aire presenta mayores ventajas en comparación con las otras dos metodologías, pues el tiempo necesario para reducir la humedad de los granos a la mitad cuando son sometidos a 50°C, es menor (2.4, 3.0 y 3.2 horas para el horno de convección con recirculación de aire, infrarrojo y convección sin recirculación de aire, respectivamente).

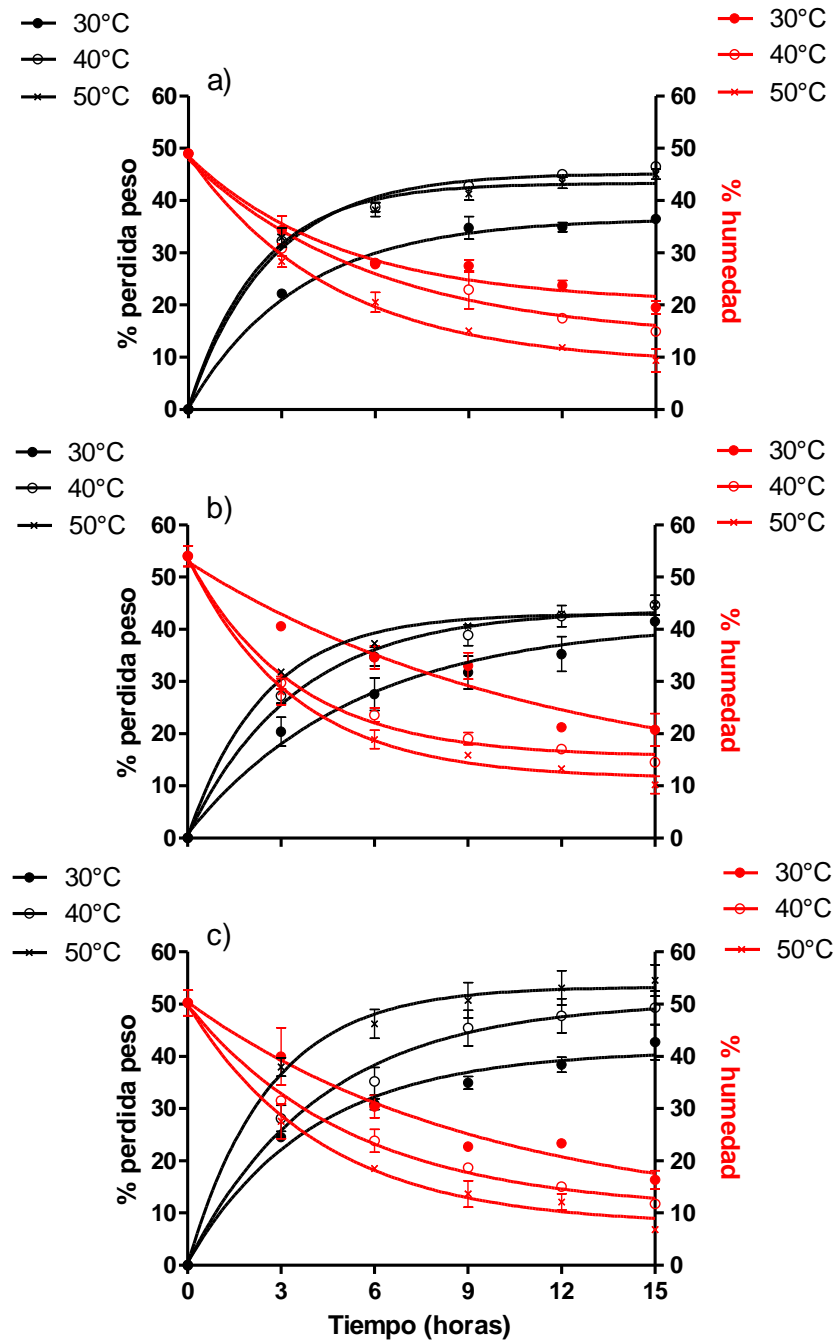


Figura 26. Curvas de secado realizadas con granos fermentados en los diferentes sistemas de secado: a) Horno de convección sin recirculación de aire, b) Horno de convección con recirculación de aire, c) Horno infrarrojo.

$$\%humedad = (humedad\ inicial - estado\ estable) * exp(-K*t) + estado\ estable$$

Ecuación 1. Modelo de decaimiento exponencial para las metodologías de secado. Donde K:

Constante de decaimiento y t: tiempo.

Tabla 12. Parámetros cinéticos para los 3 sistemas de secado.

Parámetro	Horno infrarrojo	Horno convección con aire	Horno convección sin aire
		Secado a 30°C	
Humedad inicial	50.39	52.97	48.49
estado estable	8.773	9.073	20.36
K	0.1036	0.08672	0.2049
vida media*	6.69	7.992	3.383
R	0.9303	0.9274	0.9513
		Secado a 40°C	
Humedad inicial	49.82	53.68	47.90
estado estable	10.49	15.53	13.28
K	0.1879	0.2943	0.1672
vida media*	3.689	2.355	4.146
R	0.9836	0.9847	0.9519
		Secado a 50°C	
Humedad inicial	49.90	53.79	48.60
estado estable	7.669	11.37	8.607
K	0.2319	0.2936	0.2148
vida media*	2.989	2.361	3.227
R	0.9711	0.9826	0.9871

* Tiempo necesario para disminuir la humedad a la mitad

Se observa en las curvas de secado a 50°C en las tres metodologías utilizadas, que pequeñas variaciones en el tiempo de secado para las primeras tres horas de secado, generaron grandes pérdidas de humedad. Lo anterior es importante, desde el punto de vista tecnológico y nutricional, ya que hoy en día los procesos térmicos están siendo diseñados utilizando altas temperatura a cortos tiempos,

para evitar la pérdida de características nutricionales como consecuencia de los tiempos excesivos de calentamiento [92]. En este sentido y basados en las anteriores apreciaciones experimentales, es posible proponer para los granos de cacao que el proceso de deshidratación por cualquiera de las metodologías utilizadas en este trabajo, se inicie a 50°C durante tres horas y terminar el proceso a 40°C. Este cambio en los parámetros podría permitir que el proceso de secado se realice en menor tiempo (reducción del 50% con respecto al secado a los 40°C), y a su vez podría permitir una menor pérdida de nutrientes, debido a la menor exposición de la matriz alimentaria a altas temperaturas.

La modificación en composición química de los granos de cacao dependientes de la temperatura, se puede observar en la Figura 27. Se evidencia que el contenido total de polifenoles totales disminuye, cuando el secado se realiza a altas temperaturas durante periodos de tiempo prolongados y que además, la metodología de secado utilizada presenta gran influencia en este comportamiento.

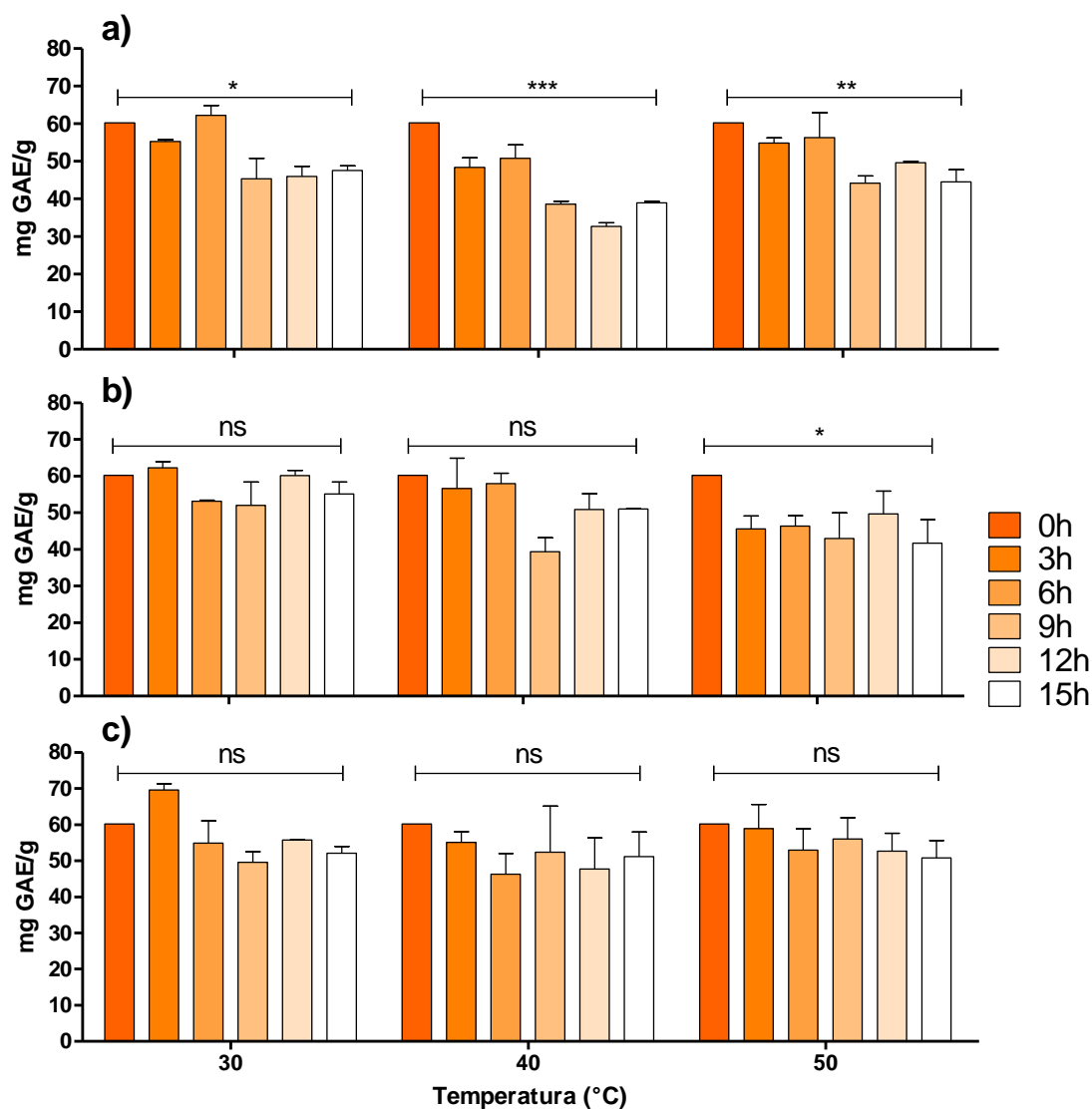


Figura 27. Efecto de las variables Tiempo y Temperatura de secado sobre el contenido de polifenoles totales, cuando el cacao es sometido a un proceso de secado controlado en a) un horno de convección sin recirculación de aire, b) un horno de convección con recirculación de aire y c) un horno infrarrojo. Cada dato es representado como media \pm DE y se presenta el análisis estadístico entre los tiempos 0 y 15 horas para todas las metodologías. (*) Diferencia estadística significativa $P < 0.05$; (**) altamente significativa $p < 0,01$; (***) fuertemente significativa $p < 0,001$ y/o (ns) no significativa.

Con estos resultados es posible asegurar que la metodología óptima para secar granos de cacao, que previamente han sido sometidos a un proceso de fermentación, es el secado en un horno infrarrojo; ya que posibilita una alta eficiencia en este proceso pudiéndose obtener porcentajes de humedad en los granos menores a 7%, cuando las condiciones de tiempo y temperatura son 15 horas y 50°C respectivamente; además de esto, bajo estas mismas circunstancias de secado la pérdida de polifenoles es cercana al 10%, permitiendo la obtención de extractos con mayor contenido en comparación con las otras metodologías utilizadas para el secado, para las que se encontró que conducían a pérdidas del 31.7 y 26.7% con los hornos de convección con y sin recirculación de aire, respectivamente. Por otra parte, la disminución en el contenido de polifenoles durante el proceso de secado al sol fue de aproximadamente 40% (Figura 15). Comparando ambos resultados, es claro que el secado de granos de cacao con el horno infrarrojo además de que es más eficiente en términos de tiempo, presenta la capacidad de disminuir la pérdida de polifenoles en el proceso de poscosecha aproximadamente un 30% (Figura 28).

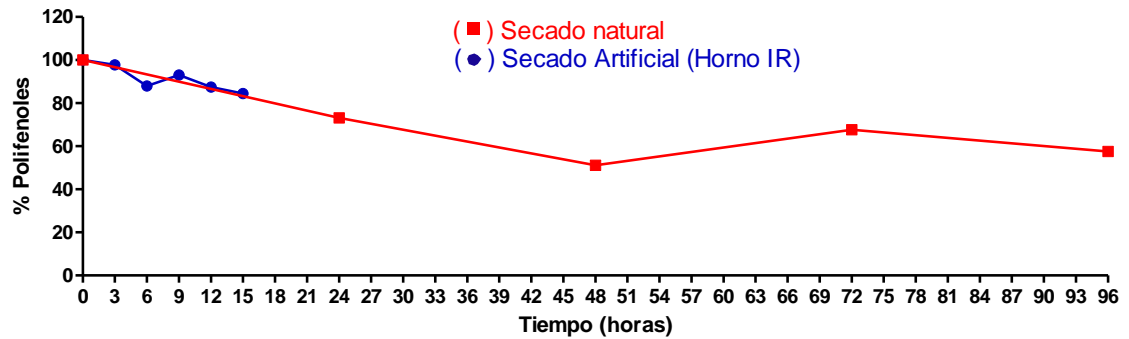


Figura 28. Comparación de la pérdida de polifenoles totales entre el secado artificial con un horno infrarrojo a 50°C y el secado natural.

Es posible proponer el secado infrarrojo como una alternativa para la obtención de productos derivados del cacao, que sean ricos en polifenoles desde los procesos de poscosecha. Una posible estrategia para evitar los cambios en la composición cuali/cuantitativa del cacao sería la realización de secados masivos en hornos infrarrojos industriales que sean dispuestos para los cultivadores de manera que permitan el secado comunitario de lotes de cacao, que posteriormente pueden ser sometidos a los procesos de industrialización, pero que contarían con valor agregado desde los primeros pasos del procesamiento.

CONCLUSIONES

Se estandarizó una metodología analítica por HPLC en fase reversa para la determinación simultánea de catequina, epicatequina, cafeína y teobromina en granos de cacao colombianos provenientes de la región santandereana.

La metodología de análisis desarrollada puede ser implementada como método de control de calidad, pues se realiza en un tiempo adecuado respecto de otras encontradas en la literatura, y se lleva a cabo con instrumental y materiales de uso corriente y disponible en la mayoría de los laboratorios de control, no requiriéndose de equipos o detectores especiales.

Durante la etapa de validación, la metodología demostró ser precisa, lineal, reproducible y selectiva frente a los metabolitos primarios presentes en los granos de cacao, especialmente frente a las grasas. Estas características la hacen adecuada y confiable para el objetivo propuesto, permitiendo la cuantificación simultánea de los analitos catequina, epicatequina, cafeína y teobromina, solos o en mezcla, en muestras provenientes de todos los estadios de los procesos de pre e industrialización del cacao.

En los granos de las 10 principales fincas proveedoras de cacao para la producción de chocolate de exportación, el contenido de polifenoles varía entre 75.5 y 43.5 mg GAE/g. Estos resultados pueden ser utilizados a nivel industrial

como referencia de control para evaluar la calidad de los granos de cacao de esta procedencia.

Existe una disminución ligera pero progresiva y consistente, en la concentración de metilxantinas, desde el inicio del secado al sol de los granos de cacao, hasta la obtención del licor en la planta de producción de chocolates. No obstante, se logró observar que la concentración de estos compuestos fue relativamente homogénea durante los procesos de poscosecha, sugiriendo que las metilxantinas no juegan un papel importante dentro de los cambios fisiológicos que le ocurren a los granos de cacao durante la fermentación.

En relación a los polifenoles y la actividad antioxidante durante las etapas de procesamiento, se encontró una disminución cercana al 60% para el contenido de polifenoles y del 45% para la actividad antioxidante, durante la fermentación y el secado al sol respectivamente; sumado a un 4.0 y 17.6% adicional de pérdida durante la industrialización.

El lote de cacao analizado dentro de este trabajo presentó entre un 10 y 20% más polifenoles totales, comparándolo con otros resultados obtenidos para cacaos colombianos. Además, al comparar con cacaos provenientes de otros orígenes geográficos, este cacao se encuentra dentro de los principales 3 con mayor contenido de polifenoles. Por lo tanto, los cacaos colombianos que son catalogados con aroma fino, presentan también ventajas comparativas en cuanto

al contenido de metabolitos con actividad biológica y por ende podrían ser más apetecidos dentro del mercado, para la preparación de alimentos funcionales.

Se constató experimentalmente que en cacaos colombianos, existe una correlación de apenas 54% entre la pérdida de polifenoles y la actividad PPO probablemente debido a que no todos los polifenoles presentes en el cacao pueden actuar como sustratos naturales de esta enzima.

Se perdió un 88.2% (12.7 a 1.5mg/g) de epicatequina, desde el inicio de la fermentación de los granos hasta la obtención del licor a nivel industrial, correlacionado en 92.2% con la disminución en la actividad antioxidante.

A medida que en el proceso global el contenido de epicatequina disminuyó, se observaron dos incrementos en la concentración de catequina; durante la fermentación y finalmente durante todos los procedimientos de industrialización, representando un aumento total en su concentración de 175%. Este comportamiento de la catequina durante la fermentación no ha sido reportado previamente, a diferencia del incremento durante la industrialización, el cual ha sido atribuido a procesos térmicos, típicos dentro de estas etapas de la cadena de producción de chocolates.

Los análisis de correlación durante la preindustrialización, mostraron que la actividad PPO explica un 63% de la pérdida de epicatequina y un 12% de la

variación en el contenido de catequina. Estos resultados sugieren que la actividad PPO y las reacciones de pardeamiento no enzimático, pueden no ser los únicos factores para explicar los cambios en la composición de polifenoles y/o catequinas de los granos de cacao durante estos procesos.

Se plantea la hipótesis de que durante la fermentación, condiciones como el pH y la temperatura, contribuyen a un proceso de epimerización que involucra la conversión de (-)-epicatequina a (-)-catequina; tal y como se ha demostrado que ocurre en el té. A pesar de lo anterior, no fue posible concluir acerca de esta hipótesis, mediante el análisis de las muestras por cromatografía quiral, y por lo tanto queda abierta para futuras investigaciones.

La estandarización de las técnicas ancestrales usadas para la fermentación y secado en campo de los granos de cacao, deberían ser el objetivo de programas mundiales que busquen homogenizar la composición de las materias primas y de los productos de chocolatería finales. En este sentido, se logró establecer que someter los granos de cacao fermentado a un proceso de secado artificial bajo un horno infrarrojo es una estrategia útil, pues comparándolo con el secado natural, es más eficiente en términos de tiempo y además presenta la capacidad de disminuir la pérdida de polifenoles aproximadamente un 30%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wood, G.A.R., Lass, R.A., Cacao. 4th ed. (1985), New York, USA: Longman.
2. ICCO. International Cocoa Organization. (2011) [cited 2011 Abril 23]; Available from: www.icco.org.
3. FAO, Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas, proyecciones al año 2010. (2004), Roma: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
4. Grupo Análisis Sectorial. Boletín de Análisis por Producto - Cacao. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá: Colombia. (Dirección de política sectorial) (2010).
5. Fedecacao. Producción de Cacao en Grano por Países: 2005 - 2010. (2011) [cited 2011 Octubre 14]; Available from: <http://www.fedecacao.com.co/cw/index.php?secinfo=14>.
6. Espinal, C.F., et al. La cadena del cacao en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogota: Colombia. (Observatorio Agrocadenas). (2005).
7. Vinson, J.A., et al. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J Agric Food Chem* (2006). **54**(21): p. 8071-6.
8. Dixon, R.A., Paiva, N.L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* (1995). **7**: p. 1085-1097.
9. Vaya, J., Aviram, M. Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Curr Med Chem – Imm., Endoc & Metab Agents* (2001). **1**: p. 99-117.
10. Macheix, J.J., et al. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit Rev Food Sci Nutr* (1991). **30**(4): p. 441-86.
11. Buta, J.C., Spaulding, D.W. Endogenous levels of phenolics in tomato fruit during growth and maturation. *J Plant Growth Regul* (1997). **16**: p. 43 - 46.

12. Ryan, D., Robards, K. Phenolic compounds in olives. Critical review. *Analyst* (1998). **123**: p. 31 - 44.
13. Robards, K., et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* (1999). **66**: p. 401 - 436.
14. Sakihama, Y., et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* (2002). **177**(1): p. 67-80.
15. Scalbert, A., Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* (2000). **130**: p. 2273S-2285S.
16. Kim, H., Keeney, P.G. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *J Food Sci* (1984). **49**: p. 1090-1092.
17. Romanczyk, L.J., et al. Cocoa extract compounds and methods for making and using the same. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/36497, Mars incorporated, USA (1997).
18. Lange, H., Fincke, A., Kakao und Schokolade. In: Acker, L., Bergner, K.-G., Diemair, W. (Eds.), *Handbuch der Lebensmittel Band VI: Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewu` Erze, Kochsalz.* (1970), New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
19. Lotito, S.B., Frei, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* (2006). **41**(12): p. 1727-46.
20. Boudet, A.M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* (2007). **68**(22-24): p. 2722-35.
21. Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* (2002). **96**(2-3): p. 67-202.
22. Tin Mar, K., et al. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *Int J Food Sci Tech* (2005). **40**: p. 323–331.
23. Abbe Maleyki, M.J., Amin, I. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules* (2008). **13**: p. 2190-2219.
24. Thompson, S.S., et al., Cocoa and coffee. In: Doyle, M.J., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology—Fundamentals and Frontiers.* (2001), Washington, D.C: ASM Press.

25. Fowler, M.S., Cocoa Beans: From Tree to Factory. In: Beckett, S.T. (Ed.), Industrial Chocolate Manufacture and Use. (1999), Oxford, UK: Blackwell Science.
26. Nielsen, D.S., et al. Investigating the fermentation of cocoa by correlating denaturing gradient gel electrophoresis profiles and near infrared spectra. *Int J Food Microbiol* (2008). **125**(2): p. 133-40.
27. Gálvez, S., et al. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *Int J Food Microbiol* (2007). **114** p. 124–130.
28. Hansen, C.E., et al. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *J Sci Food Agric* (1998). **77**: p. 273-281.
29. Ndukwu, M.C. Effect of drying temperature and drying air velocity on the drying rate and drying constant of cocoa bean. *Agr. Eng. Int.: CIGR E J* (2009). **11**(Manuscript 1091).
30. Zahouli, G.I.B., et al. Effect of drying Methods on the Chemical Quality Traits of Cocoa Raw Material. *Adv J Food Sci Tech* (2010). **2**(4): p. 184-190.
31. Wollgast, J., Anklam, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int* (2000). **33**: p. 423-447.
32. Minifie, B.W., Chocolate, cocoa and confectionary: Science and technology. (1989), New York: Chapman & Hall.
33. Misnawi, et al. Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chem* (2004). **85**: p. 73–80.
34. Luna, F., et al. Chemical Composition and Flavor of Ecuadorian Cocoa Liquor. *J Agric Food Chem* (2002). **50**: p. 3527-3532.
35. Miller, K.B., et al. Impact of Alkalization on the Antioxidant and Flavanol Content of Commercial Cocoa Powders. *J Agric Food Chem* (2008). **56**: p. 8527–8533.
36. Kurosawa, T., et al. Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* (2005). **179**: p. 237–246.

37. Andres-Lacueva, C., et al. Flavanol and Flavonol Contents of Cocoa Powder Products: Influence of the Manufacturing Process. *J. Agric. Food Chem* (2008). **56**: p. 3111–3117.
38. Adeyeye, E.I., et al. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. *Food Chem* (2010). **118**: p. 357–363.
39. Gu, L., et al. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J Agric Food Chem* (2006). **54**(11): p. 4057-61.
40. Kealy, E.a. Patent: 6,312,753. Cocoa components, edible products having enriched polyphenol content, methods of making same and medical uses United States (2001).
41. Niemenak, N., et al. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J Food Compos Anal* (2006). **19** p. 612–619.
42. Singleton, V.L., Rossi, J.A., Jr. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* (1965). **16**(3): p. 144-158.
43. Londoño, J., et al. Citrus juice inhibits low density lipoprotein oxidation: relationship between free radical scavenger activity and electrophoretic mobility. *Rev Chil Nutr* (2006). **33**(3): p. 544-548.
44. AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. AOAC (2002).
45. AEFI. Validación de métodos analíticos. AEFI (2001): p. 73-74.
46. Markham, K.R., Bloor, S.J., Analysis and identification of Flavonoids in practice. In C. A. Rice-Evans, & L. Packer, *Flavonoids in health and disease*. (1998), New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.
47. Hui, Y.H., et al., *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. 1st ed. Blackwell. (2006).
48. Velickovic, D.T., et al. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrason Sonochem* (2006). **13**(2): p. 150-6.
49. Wang, L., Weller, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech* (2006). **17**: p. 300–312.

50. Saldaña, M.D.A., et al. Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane. *Fluid Phase Equilibr* (2002). **194–197**: p. 885–894.
51. Chen, L., et al. Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Herba Epimedii*. *Sep Purif Technol* (2008). **59** p. 50–57.
52. Chen, F., et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrason Sonochem* (2007). **14**: p. 767–778.
53. Shouqin, Z., et al. Experiment study on ultrahigh pressure extraction of Ginsenosides. *J Food Eng* (2007). **79**: p. 1–5.
54. Peres, V.F., et al. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *J Chromatogr A* (2006). **1105**(1-2): p. 115-8.
55. Wang, L., Weller, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech* (2006). **17**: p. 300–312.
56. Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends Anal Chem* (2003). **22**: p. 41-47.
57. Hemwimol, S., et al. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason Sonochem* (2006). **13**(6): p. 543-8.
58. Xia, T., et al. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. *J Food Eng* (2006). **74**: p. 557–560.
59. Lee, H.S., Widmer, B.W, Phenolic compounds. In L. M. L. Nollet, *Handbook of food analysis* (Vol. 1) Basel. (1996), New York, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.
60. Quatrochi, O.A., et al., *Introducción a la HPLC: Aplicación y Practica*. . (1992), Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A.
61. Brunetto, M.D.R., et al. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chem* (2007). **100**: p. 459–467.

62. Gil, A., et al. The edaphoclimatic conditions affect the polyphenol content in cocoa: A first step for the crop "origin denomination". Datos no publicados (2011).
63. Nazaruddin, R., et al. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Ind Crop Prod* (2006). **24**: p. 87–94.
64. Cooper, K.A., et al. Rapid reverse-phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationship of their concentration in chocolate. *J Agric Food Chem* (2007). **55**: p. 2841-2847.
65. Indcresa. Proceso del Cacao. (2011) [cited 2011 Noviembre 24]; Available from: www.indcresa.com.
66. Mayer, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* (2006). **67**(21): p. 2318-2331.
67. AOAC. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. 376-384. AOAC (1980).
68. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976). **72**: p. 248–254.
69. Kishida, E., et al. Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption. *J Agr Food Chem* (2002). **41**(10): p. 1598-1600.
70. Ou, B., et al. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem* (2001). **49**: p. 4619-4626.
71. Erat, M., et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chem* (2005). **95**: p. 503-508.
72. Herrmann, K. Neuere Erkenntnisse ueber Kakaoeinhaltsstoffe. II. Catechine und Procyanidine und deren oxidative Kondensation sowie Ballaststoffe der Kakaoschalen. *Gordian* (1995). **95**: p. 141-143.
73. Tomas-barberán, F.A., et al. A New Process To Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans. *J Agric Food Chem* (2007). **55**: p. 3926-3935.

74. USDA. Nutrient Data Laboratory. Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture. (2010). **2**: p. 39.
75. Adamson, G.E., et al. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* (1999). **47**(10): p. 4184-8.
76. Sakharov, I.Y., Bautista Ardila, G. Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. *Food Chem* (1999). **65**: p. 51-54.
77. Prota, G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev* (1988). **8**: p. 525–556.
78. Aniszewski, T., et al. Research on catecholases, laccases and cresolases in plants. Recent progress and future needs. *Acta Biol Cracov Bot* (2008). **50**: p. 7–18.
79. de Brito, E.S., et al. Effect of polyphenol oxidase (PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (2002). **22**: p. 45-48.
80. Nobuyoshi, I., et al. Epimerization of Tea Catechins under Weakly Acidic and Alkaline Conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* (2010). **74**: p. 875-877.
81. Suzuki, M., et al. Epimerization of tea catechins and o-methylated derivatives of (-) epigallocatechin-3-o-gallate: Relationship between epimerization and chemical structure. *J Agric Food Chem* (2003). **51**: p. 510–514.
82. Wang, H.F., Helliwell, K. Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chem* (2000). **70**: p. 337–344.
83. Seto, R., et al. Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment. *Biosci Biotechnol Biochem* (1997). **61**: p. 1434–1439.
84. Tagro Guehi, S., et al. Effect of Turning Beans and Fermentation Method on the Acidity and Physical Quality of Raw Cocoa Beans. *Adv J Food Sci Technol* (2010). **2** p. 163-171.
85. Ellis, C.J., et al. Enantiomerism: A characteristic of the proanthocyanidin chemistry of the Monocotyledonae. *Phytochemistry* (1983). **22**: p. 483-487.

86. Kofink, M., et al. (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiome. *Molecules* (2007). **12**: p. 1274-1288.
87. Payne, M.J., et al. Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *J Agric Food Chem* (2010). **58**: p. 10518-27.
88. Ottaviani, J.I., et al. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo. *Free Radical Bio Med* (2011). **50**: p. 237–244.
89. Lotito, S.B., Fraga, C.G. Catechins delay lipid oxidation and alpha-tocopherol and beta-carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* (2000). **225**: p. 32-38.
90. Donovan, J.L., et al. (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: Relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free Rad Res* (2006). **40**: p. 1029-1034.
91. Hebbar, H.U., Rastogi, N.K. Mass transfer during infrared drying of cashew kernel. *J Food Eng* (2001). **47**(1): p. 1-5.
92. Maldonado, R.J., Pacheco-Delahaye, E. Curvas de deshidratación del brócoli (*Brassica oleraceae* L var. *Italica Plenck*) y coliflor (*Brassica oleraceae* L var. *Botrytis* L). *Rev Fac Agron (LUZ)* (2003). **20**: p. 306-319.
93. Mulet, A., et al. Drying model for highly porous hemispherical bodies. *Eur Food Res Technol* (1999). **210**: p. 80-83.