

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



TESIS

**DEGRADACIÓN DE POLIFENOLES DEL CACAO (*Theobroma cacao*
L.) CRIOLLO DE AMAZONAS DURANTE EL TOSTADO**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

AUTOR : Bach. Editha Fernández Romero
ASESOR : Ing. Ms. Efraín Manuelito Castro Alayo
CO ASESOR : Ms. Segundo Grimaldo Chavez Quintana

CHACHAPOYAS – PERÚ

2018

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTO

Los resultados de esta tesis, están dedicados a todas aquellas personas que, de alguna forma, son parte de su culminación. Mis más sinceros agradecimientos están dirigidos a mis asesores al Ing. Ms. Efraín Manuelito Castro Alayo y Ms. Segundo Grimaldo Chavez Quintana, gracias por su dedicación, motivación y criterio. Han hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

Y por encima de todo y con todo mi cariño a mis padres y a mi novio por estar incondicionalmente conmigo, por su apoyo, consejos, comprensión, amor. Me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios, carácter, empeño, perseverancia, coraje para conseguir mis objetivos.

AUTORIDADES UNIVERSITARIA

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI
RECTOR

Dr. MIGUEL ANGEL BARRENA GURBILLON
VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. FLOR DE TERESA GARCÍA HUAMÁN
VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Ing. Ms. EFRAÍN MANUELITO CASTRO ALAYO
DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

JURADO EVALUADOR

Ing. Mg. Sc. Armstrong Barnard Fernández Jeri

PRESIDENTE

Ing. Ms. Robert Javier Cruzalegui Fernández

SECRETARIO

Ing. Guillermo Idrogo Vásquez

VOCAL

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo Editha Fernández Romero identificado con DNI N° 47255860; Estudiante de la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Amazonas.

DECLARO BAJO JURAMENTO QUE:

1. Soy autor de la tesis titulada “Degradación de polifenoles del cacao (*Theobroma Cacao* L.) criollo de Amazonas durante el tostado”.

La misma que presento para optar: El Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. Los datos presentados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo asumir todas las cargas pecuniarias que pudiera derivarse para LA UNTRM en favor de terceros por motivos de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas 29 de noviembre de 2018.

VISTO BUENO DEL CO ASESOR

Yo Ms. Segundo Chavez Quintana, docente de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas que suscribe el presente trabajo de tesis, mediante el presente hago constar:

Que he asesorado el proyecto de tesis denominado “**DEGRADACIÓN DE POLIFENOLES DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) CRIOLLO DE AMAZONAS DURANTE EL TOSTADO**”, presentado por la bachiller Editha Fernández Romero, egresado de la escuela profesional de ingeniería Agroindustrial, comprometiéndome a colaborar en la elaboración, presentación, levantamiento de observaciones, ejecución del proyecto de tesis y presentación del informe final para la sustentación del mismo.

El suscrito da el visto bueno al informe de la tesis antes mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 29 de Noviembre del 2018.

Ms. SEGUNDO CHAVEZ QUINTANA
Co asesor



ANEXO 2-N

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 04 de Diciembre del año 2018, siendo las 3:00pm horas, el aspirante: Editha Fernández Romero defiende públicamente la Tesis titulada: Degradación de polifenoles del cacao (Theobroma cacao L.) Criollo de Amazonas durante el tostado para optar el Título Profesional en Ingeniería Agroindustrial otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado, constituido por:
 Presidente: Ing. Mg. Sc. Armstrong Bernard Fernández Jari
 Secretario: Ing. Mg. Robert Javier Cruzalegui Fernández
 Vocal: Ing. Guillermo Idrogo Vázquez



Procedió el (los) aspirante (s) a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideran oportunas, las cuales fueron contestadas por el los aspirante (s).

Tras la intervención de los miembros del jurado y las oportunas contestaciones del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los miembros del jurado presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

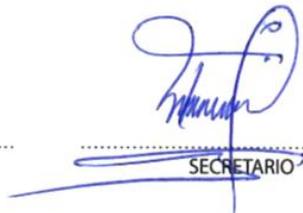
Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

Notable o sobresaliente (X) Aprobado () No apto ()

Otorgada la calificación el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las horas 4:05pm del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación del Trabajo de Investigación.


PRESIDENTE


SECRETARIO


VOCAL

OBSERVACIONES:

Tabla de contenido

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
AUTORIDADES UNIVERSITARIA.....	IV
JURADO EVALUADOR.....	V
DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO.....	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
III. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Cacao.....	4
3.2. Tostado.....	7
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
4.1. Material de estudio.....	8
4.2. Equipos y reactivos.....	8
4.3. Diseño experimental.....	8
4.4. Preparación de la muestra.....	9
4.5. Cuantificación de polifenoles totales.....	10
4.6. Cuantificación de catequina y epicatequina.....	10
4.7. Determinación del mejor tratamiento.....	11
4.8. Cinética.....	11
4.9. Procedimiento.....	11
4.10. Análisis de datos.....	11
V. RESULTADOS.....	12

VI. DISCUSIÓN.....	23
VII. CONCLUSIONES.....	24
VIII.RECOMENDACIONES	24
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS	30

Índice de tabla

Tabla 1. Composición química del grano de cacao sin fermentar.....	5
Tabla 2. Arreglo experimental.....	8
Tabla 3. Contenido de (-) - catequina, (-) - epicatequina y polifenoles totales durante . el tiempo de tostado.....	12
Tabla 4. Compocición del contenido de (-) - catequina, (-) - epicatequina y polifenoles totales.....	12
Tabla 5. Contenido de polifenoles en diferentes tiempos de tostado (Test de Duncan).....	15
Tabla 6. Contenido de polifenoles en las diferentes temperaturas de tostado (Test de Duncan)	18
Tabla 7. Contenido de catequina, epicatequina y polifenoles totales en sus diferentes tratamientos de tostado.....	31
Tabla 8. Concentraciones de polifenoles totales, (-) - catequinas, (-) - epicatequinas y polifenoles totales sin tratamientos.	34
Tabla 9. Analisis de varianza.....	35

Índice de figuras

Figura 1. Cromatograma de extracto de cacao tostado, mostrando (-) - catequina (a) y la degradación total de la (-) - epicatequina (b).....	13
Figura 2. Cromatograma de extracto de cacao tostado, mostrando la mejor concentración de (-) - catequina (a) a una temperatura de 170°C en 30 minutos.....	14
Figura 3. Cromatograma de extracto de cacao tostado, mostrando la mejor concentración de (-)- epicatequina (b) en una temperatura de 130°C en 10 minutos.....	14
Figura 4. Comportamiento de la curva del contenido de polifenoles totales y su línea de tendencia durante el tiempo de tostado del cacao criollo.....	16
Figura 5. Comportamiento de la curva del contenido de (-) - catequina y su línea de tendencia durante el tiempo de tostado del cacao criollo.....	16
Figura 6. Comportamiento de la curva del contenido de (-) - epicatequina y su línea de tendencia durante el tiempo de tostado del cacao criollo.....	17
Figura 7. Degradación del contenido de fenoles totales durante la temperatura de tostado del cacao criollo	19
Figura 8. Degradación del contenido de (-) - epicatequina durante la temperatura de tostado del cacao criollo.....	19
Figura 9. Evolución del contenido de (-) - catequina y su línea de tendencia durante la temperatura de tostado del cacao criollo.....	20
Figura 10. Degradación de poli fenoles totales en relación del tiempo y temperatura.	20
Figura 11. Degradación de (-) - epicatequina en relación temperaturas y tiempo del proceso de tostado.....	21
Figura 12. Evolución de la curva cinética de la degradación de los polifenoles totales, (-) – catequina, (-) - epicatequina durante el tiempo de tostado.....	22
Figura 13. Evolución de la curva cinética de la degradación de polifenoles, (-) – catequina y (-) epicatequina durante la temperatura de tostado.	22
Figura 14. Pesado de 100g de muestras de cacao criollo para ser tostados.....	36
Figura 15. Tostado de 100g de cacao criollo de Amazonas.	37
Figura 16. Muestras tostadas con su respectiva rotulación.	37
Figura 17. Polvo de cacao listo para ser desgrasados.....	38
Figura 18. Viales con concentración de ácido gálico para crear una curva de calibración.	38

Figura 19. Preparando muestras para la lectura de polifenoles totales spectrophotometer.....	39
Figura 20. Inyección de muestra al HPLC.	39
Figura 21. Muestras para la lectura de polifenoles totales en espectofotometro.....	39
Figura 22. Lectura de polifenoles totales en el equipo espectrofotometro.....	39

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la degradación de polifenoles del cacao criollo de Amazonas durante el tostado. Los granos de cacao fueron sometidos a siete temperaturas (90, 110, 130, 150, 170, 190 y 200 °C) y cinco tiempos de tostado (10, 20, 30, 40 y 50 min). Se cuantificaron las catequinas más importantes ((-) - catequina y (-) - epicatequina) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y polifenoles totales mediante la técnica de Folin Ciocalteu. Se observó en todos los tratamientos de tostado la degradación de polifenoles, mostrando niveles de disminución, tanto en fenoles totales (desde 94,790 hasta 8,648 mg /g), cuanto en (-) epicatequina (desde 32,549 hasta 0,000 mg/g) y (-) catequina (desde 4,657 hasta 1,597 mg/g). Siendo así que el efecto de la temperatura fue mayor en la degradación de polifenoles. Se concluye que conforme aumenta la temperatura y tiempo de tostado la degradación de polifenoles de cacao es mayor e incluso llegando a perderse totalmente.

Palabras claves: Degradación, fenoles totales, – (-) epicatequina, - (-) catequina.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the degradation of polyphenols in the Amazonas cocoa during roasting. The cocoa beans were subjected to seven temperatures (90, 110, 130, 150, 170, 190 and 200 ° C) and five roasting times (10, 20, 30, 40 and 50 min). The two most important polyphenols (catechin and epicatechin) were quantified by high efficiency liquid chromatography (HPLC) and total polyphenols using the Folin Ciocalteu technique. The degradation of polyphenols was observed in all roasting treatments, showing levels of decrease, both in total phenols (from 94,790 to 8,648 mg / g), as in (-) - epicatechin (from 32,549 to 0,000 mg / g) and (-) - catechin (from 4,657 to 1,597 mg / g). Thus, the effect of temperature was greater in the degradation of polyphenols. It is concluded that as the temperature and time of roasting increases, the degradation of cocoa polyphenols is greater and even getting completely lost.

Keywords: Degradation, total phenols, (-) - epicatechin and (-) - catechin

I. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) ha tenido una gran importancia en el desarrollo agrícola del Perú desde la época de la Colonia, debido a la producción de alta calidad (Portillo, 2006); actualmente, en el mundo se produce más de 4,6 millones de toneladas (Calderón et al., 2015).

Alrededor del 44% de la producción corresponde a cacao fino (criollo, nativo) y el 56% de la producción es cacao corriente o común (CCN-51 y forastero) (MINAGRI, 2012); la región Amazonas el cultivo de cacao representa el 4% de la producción nacional con 4 529,20 toneladas de cacao en grano seco, es una de las actividades de larga tradición en las provincias de Bagua y Utcubamba, por las condiciones edafoclimáticas apropiadas que permiten obtener granos de alta calidad («Región Amazonas Presentara Cacao “Aroma y Sabor Nativo de los Dioses Para el Mundo», 2015).

El grano de cacao presenta múltiples beneficios para la salud debido a su elevado contenido de polifenoles (Carrillo, Londoño-Londoño, y Gil, 2014); aproximadamente 15% de peso seco en polifenoles (Vázquez, Ovando, Adriano, Betancur, y Salvador 2016); un promedio de 21 – 43 mg/g de (-)-epicatequina de muestra desgrasa, seguida de (+) - catequina (Ackar et al., 2013); así mismo posee una gran capacidad antioxidante (Carrillo et al., 2014) y ha sido estudiado como anticancerígeno, antiinflamatorio, antihepatotóxico, antibacteriano, antiviral (Ackar et al., 2013).

En el procesamiento del grano cacao, el tostado es la operación tecnológica más importante, generando el color marrón característico, aroma suave y textura (Ramli, Hassan, Said, Samsudin, y Idris, 2006); el tostado desarrolla el sabor a cacao, reduce la humedad, acidez y libera la cáscara de los granos. El cacao normalmente se tuesta a temperaturas entre 120 °C y 140 °C (Beckett, 2009). Alrededor de 400 compuestos volátiles han sido aislados en el cacao tostado, entre las familias químicas más representativas están aldehídos, ésteres, fenoles, nitrilos, compuestos azufrados, pirazinas, furanos, oxazoles, cetonas, alcoholes, y ésteres (Álvarez et al., 2012); el número total de compuestos aromáticos varía según el grado de la temperatura y el tiempo de tostado (Ramli et al., 2006).

El proceso de tostado no solo genera nuevos compuestos volátiles para aroma específico, si no también pérdida de polifenoles, que afectan el aroma final del

chocolate (Rusconi y Conti, 2010). La degradación significativa de (-) - epicatequina y (+) – catequina tienen lugar a las altas temperaturas de tostado (Schinella et al., 2010).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la degradación de polifenoles del cacao criollo de Amazonas durante el tostado.

2.2. Objetivos específicos.

- ✓ Evaluar el contenido de polifenoles totales en cacao criollo durante el tostado.
- ✓ Cuantificar el contenido de (-) - epicatequina por HPLC durante el tostado del cacao.
- ✓ Determinar el tiempo y temperatura de tostado con mayor contenido de polifenoles de cacao criollo.
- ✓ Construir la curva de cinética de polifenoles en cacao criollo durante el tostado.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Cacao

Theobroma Cacao L. es el nombre científico que recibe el árbol del cacao, que en griego significa “alimento de los dioses”; sin embargo cacao viene del maya Ka’kaw. El cacao es originario de América del Sur, específicamente de las cuencas hidrográficas del alto Amazonas y Orinoco, al este de la cordillera de los Andes (Ponce y Chang, 2015); es un árbol pequeño, de 12-15 m de altura y de hojas perennes que tienen hasta 300 mm de largo. Las flores, y por lo tanto los frutos (mazorcas de cacao) crecen en el tronco y las ramas más gruesas (Beckett, 2009); el árbol es delicado y exigente, necesita de una temperatura que oscilan entre 20 y 30°C. Cada árbol produce hasta 2 kg de semillas frescas de cacao por año (Ascrizzi, Flamini, Tessieri, y Pistelli, 2017).

3.1.1. Tipo criollo

Son árboles poco vigorosos, de lento crecimiento, bajo rendimiento y más susceptibles a enfermedades y plagas que otras variedades (Calderón et al., 2015). Sin embargo su fruto se caracteriza por ser altamente aromático y desarrollar sabores suaves, a nuez, terrosos, florales o similares al té

(Aprotosoai, Luca, y Miron, 2016); tienen cotiledones blancos y son susceptibles a enfermedades y es de bajo rendimiento (Beckett, 2009). Sus semillas son aromáticas y con baja amargura: razones que hacen de la materia prima ideal para un chocolate de calidad (Ascrizzi et al., 2017). Solo representa entre el 5% al 8% de la producción mundial (Calderón et al., 2015).

3.1.2. Composición química

La composición de los granos de cacao es muy variable, dependiendo de genética, fermentación, secado y manipulación durante el envío y el almacenamiento (Diab, Hertz-Schünemann, Streibel, y Zimmermann, 2014).

Tabla 1. Composición química del grano de cacao sin fermentar.

Componentes	Grano seco%	Desgrasadas %
Cotiledones	89,60	-
Cascara	9,63	-
Germen	0,77	-
Grasa	53,05	-
Agua	3,65	-
Cenizas totales	2,63	6,07
Nitrógeno total	2,28	5,27
Nitrógeno proteico	1,50	3,46
Teobromina	1,71	3,95
Cafeína	0,085	0,196
Glucosa	0,30	0,69
Sacarosa	1,58	3,86
Almidón	6,10	14,09
Pectina	2,25	5,20
Fibra	2,09	4,83
Mucilago	0,38	0,88
Polifenoles	7,54	17,43
Ácido acético	0,014	0,032
Oxálico	0,29	0,67

Fuente: (Afoakwa, Paterson, Fowler, & Ryan, 2008).

3.1.3. Compuestos polifenólicos del cacao

Los principales compuestos polifenólicos se localizan en tres grupos, las catequinas que representan el 37% ; las antocianinas con cerca del 4% y las proantocianidinas con el 58%; del primer grupo, la epicatequina compone el 98% del total de las catequinas, (Vázquez et al, 2016.); teniendo estos tres grupos un promedio de 120 – 180g/kg en cacao sin fermentar (Ackar et al., 2013); y 12 al 18 % de fenoles totales del peso total del grano de cacao tostado (Rusconi y Conti, 2010). El principal compuesto de polifenoles en el grano de cacao fresco es (-) - epicatequina , con un contenido promedio de 21 - 43 mg / g de muestra desgrasada, seguida de (+) – catequina (Ackar et al., 2013) . El contenido de polifenoles puede disminuir hasta el 10% en el producto final de cacao a lo largo los diferentes procesos de fabricación (fermentación, tostado) (Rusconi y Conti, 2010).

3.1.4. Catequinas

En granos de cacao fresco los niveles más altos están en (-) - epicatequina ($13,35 \pm 2,24$ mg / g) con 24 veces menos (+) - catequina ($0,56 \pm 0,05$ mg / g) y no se encuentran contenido de (-) - catequina (Payne, Hurst, Miller, Rank, y Stuart, 2010); la (-) - epicatequina contiene 34,65 a 43,2 mg / g de muestra desgrasada , dependiente del lugar de producción, (Rusconi y Conti, 2010).

Durante las condiciones de un tostado progresivo es decir tostado bajo, medio y alto, hay una pérdida progresiva de (-) - epicatequina y (+) - catequina y un aumento en (-) - catequina con los niveles de tostado más altos (Hurst et al., 2011) Es el resultado de la epimerización de (-) - epicatequina y (+) - catequina durante el tostado (Caligiani, Cirlini, Palla, Ravaglia, y Arlorio, 2007).

3.1.5. Importancia de los polifenoles de cacao

Los polifenoles son inhibidores de enzimas que aumentan el estrés oxidativo, una carbohidratos y proteínas , estas propiedades les permiten actuar como: anticancerígeno, antiinflamatorio, antihepatotóxico, antibacteriano, antiviral y compuestos antialérgicos (Ackar et al., 2013) y reducen el estrés y la depresión, protegen contra las enfermedades cardíacas (Djikeng et al., 2018). Siendo la (-) - epicatequina el estereoisomero simple con mejores resultados sobre la salud cardiovascular, presenta la mayor capacidad de dilatación arterial (Sotelo, Alvis y Arrázola, 2015).

Los polifenoles confieren sensación de amargor y astringencia y contribuyen a los olores a verde y afrutado de las almendras de cacao (Vázquez et al., 2016), también contribuyen al color marrón rojizo característico de los derivados del cacao (D'Souza et al., 2017). Además, son los principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C, y 100 veces superior a la vitamina E (Quiñones, 2012).

3.2.Tostado

El tostado es la operación tecnológica más importante en el procesamiento de granos de cacao, genera la formación del color marrón, aroma suave y textura del cacao tostados (Ramli et al., 2006); estas características son el resultado de la oxidación, polimerización de polifenoles, degradación de proteínas y reacciones de Maillard (Suazo, Davidov-Pardo, y Arozarena, 2014).

Es un tratamiento de aire caliente de las semillas en un rango de temperatura entre 110 y 140 ° C: (Ascrizzi et al., 2017); y entre temperaturas 130 y 150 ° C durante 15 - 45 minutos (Krysiak, 2006). Ha temperaturas más altas conducen a un sobre tostado, con pérdida de las características agradables del cacao y el sabor quemado (Ascrizzi et al., 2017); la elección de las condiciones de tostado depende del tipo de cacao, el período de recolección, su origen, el tratamiento poscosecha y el tipo de sabor deseado (Ramli et al., 2006).

El tostado conduce a una reducción de 2,5% de agua, eliminación parcial del ácido acético y desarrollo de los compuestos aromáticos de origen térmico (Álvarez et al., 2012). Durante el tostado, los precursores del sabor que se desarrollan durante la fermentación interactúan para producir el sabor a chocolate deseado, que se forma entre los aminoácidos y azúcares a través de la reacción de Maillard (Djikeng et al., 2018). Cuando los granos de cacao se tuestan en temperaturas baja, media y alta, hay una pérdida progresiva de (-) - epicatequina y (+) - catequina y un aumento en (-) - catequina con los niveles de tostado más altos (Hurst et al., 2011).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material de estudio

Las muestras de granos de cacao fermentado y seco fueron proporcionadas por la Asociación de Productores Cacaoteros y Cafetaleros de Amazonas (APROCAM) del distrito de Bagua, región Amazonas, Perú. La variedad estudiada fue Criollo, con 7% de humedad; cosechado en entre marzo - mayo, del Centro Poblado Lluhuana, distrito de Bagua.

4.2. Equipos y reactivos

Cromatógrafo Líquido de alta Eficiencia (HPLC), Hitachi Elite Lachrom, Japón

Centrifuga MPW – 215, Polonia

Estufa Estilizadora, Secadora MMM-GROUP, Ecogil 222, Alemania

Espectrofotómetro S2100 UVTE – Único, USA

Balanza analítica OHAUS - USA

Equipo de filtro al vacío Vacubrand 1c, Alemania.

Vortex Mexer Cole Parmer; S01000A-CP, Japón.

Reactivos

Reactivo de Follin Cioalteru, Sigma Aldrich, USA

Estándar (-) - Catechin 97%, Sigma Aldrich, Japón

Estándar (-) - Epicatechin 98%, Sigma Aldrich, China

Metanol 99.88%, J.T.Baker, USA

Éter de petróleo, J.T.Baker, USA

4.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de tipo factorial 5A x 7B con cuatro réplicas. Los granos de cacao fueron tostados a temperaturas (90, 110, 130, 150, 170, 190, 200) °C, con tiempos de tostados (10, 20, 30, 40, 50) minutos.

Tabla 2. Arreglo experimental

Factor	Tratamientos		Repeticiones	Unidad Experimental
	t (minutos)	°T (temperatura)		
Concentracion es de	t ₁ = 10	°T ₁ = 90°C	R ₁ – R ₄	
		°T ₂ = 110°C	R ₁ – R ₄	
		°T ₃ = 130°C	R ₁ – R ₄	
		°T ₄ = 150°C	R ₁ – R ₄	
		°T ₅ = 170°C	R ₁ – R ₄	

	Tostado		°T ₆ = 190°C	R ₁ – R ₄	140
			°T ₇ = 200°C	R ₁ – R ₄	
		t ₂ = 20	°T ₁ = 90°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₂ = 110°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₃ = 130°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₄ = 150°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₅ = 170°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₆ = 190°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₇ = 200°C	R ₁ – R ₄	
		t ₃ = 30	°T ₁ = 90°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₂ = 110°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₃ = 130°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₄ = 150°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₅ = 170°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₆ = 190°C	R ₁ – R ₄	
		t ₄ = 40	°T ₁ = 90°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₂ = 110°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₃ = 130°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₄ = 150°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₅ = 170°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₆ = 190°C	R ₁ – R ₄	
		t ₅ = 50	°T ₁ = 90°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₂ = 110°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₃ = 130°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₄ = 150°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₅ = 170°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₆ = 190°C	R ₁ – R ₄	
			°T ₇ = 200°C	R ₁ – R ₄	

4.4.Preparación de la muestra

Las muestras de cacao fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Suazo, Davidov-Pardo y Arozarena (2014) con algunas modificaciones. Tres gramos de muestras tostadas fueron descascarillados y molidos hasta obtener polvo de cacao. Luego 1 g de polvo de cacao fueron colocados en tubos de ensayo de 10 ml, se mezcló con 5 ml de éter de petróleo agitándose durante 1 min en el equipo de Vortex (Mixer Cole Parmer; S01000A-CP, Japón). La mezcla se centrifugo a 3 000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente usando una centrifuga (MPW – 215, Polonia). El proceso

se repitió cuatro veces y el cacao desgrasado polvo se dejó durante la noche a temperatura ambiente para eliminar el solvente. El extracto para determinación de polifenoles totales se desarrolló por el método propuesto de Jonfia-Essien, West, Alderson y Tucker (2008) se utilizó 0,5 g de muestra desgrasada se mezcló con 24 ml de un 30% solución de metanol, 6 ml agua ultra pura se homogenizo en un agitador magnético durante 30 min. El extracto luego se filtró a través de un equipo de filtro al vacío vacubrand 1C, Alemania.

4.5. Cuantificación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó siguiendo el método de Folin Ciocalteu propuesto por Hu et al. (2016). Se preparó ocho viales con concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 ppm de solución de ácido gálico a partir de una solución madre de 100 ppm para crear una curva de calibración. El extracto de muestra 0,1 ml se mezcló con 7,9 ml de agua y 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocateu durante 5 minutos a 22°C en estufa (MMM-GROUP, Ecogil 222, Alemania). Luego se añadió 1,5 ml de solución saturada de carbonato de sodio; los reactivos añadidos se mezclaron completamente agitándose vigorosamente durante 10s en Vortex (Mixer Cole Parmer; S01000A-CP, Japón). La mezcla fue incubado en estufa a 22°C durante 2 horas antes de la determinación de la absorbancia a 765nm usando un espectrofotómetro (UV/ Visible S2100 UVTE, ÚNICO). Cada extracto de muestra fue analizado por cuadruplicado.

4.6. Cuantificación de catequina y epicatequina

Las concentraciones de (-)-epicatequina se realizó mediante un análisis cromatográfico por HPLC según el método propuesto por Wang, Helliwell, & You, (2000), con alguna modificaciones.

Se utilizó un cromatógrafo Hitachi Elite Lachorom, Japón; el organizador L-2000 serie 17E18 – 0851, bomba L-2130 serie 17E05-017, detector UV Vis L-2420 serie 17E17-010. La columna utilizada fue un C18 Kingsorb de fase inversa 5 mm (150 4,6 mm). La fase móvil adoptada para este estudio fue metanol /agua / ácido ortofosfórico (20 / 79,9 / 0,1) y la tasa de flujo fue de 1,0 mL / min. La longitud de onda de absorción fue seleccionada a 210 nm. La columna se hizo funcionar a temperatura ambiente. El volumen de inyección de muestra fue de 20 uL. Los espectros UV obtenido para cada pico, después de la resta de la correlación el espectro de base de UV correspondiente, se normalizó por computadora y las tramas

fueron superpuestas. Los picos cromatográficos en las muestras fueron identificados comparando su tiempo de retención y espectro UV con los estándares de referencia.

4.7.Determinación del mejor tratamiento

Los tratamientos de tostados fueron sometidos a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y a la técnica de Folin Ciocalteu para determinar el contenido de (-) - epicatequina, (-) - catequina y polifenoles totales se analizó en el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

4.8.Cinética

Se determinó la curva cinética en Ms Excel 2010, en los diferentes tiempos de tostado contra los diferentes contenidos de polifenoles totales, (-) - epicatequina y (-) - catequina, como también se realizó entre temperaturas de tostado y las concentraciones de los polifenoles antes mencionados.

4.9.Procedimiento

Se pesó 100 g de cacao criollo seco y fermentado con una humedad del 2%, y se tostaron a siete temperaturas y cinco tiempos diferentes, en una maquina Tostadora de Cacao INSA, ERTC-5. Tres granos de cacao tostado fueron molidos en morteros, luego se pesó 1g de cacao molido (polvo) y colocados en tubos de ensayo, se mezcló con éter de petróleo agitándose en el equipo Vortex Mexer Cole Parmer; S01000A-CP, Japón. La mezcla se centrifugo a temperatura ambiente usando una centrífuga (MPW – 215, Polonia). El proceso se repitió cuatro veces y el cacao desgrasado se dejó durante la noche a temperatura ambiente para eliminar el solvente. Para los compuestos fenólicos 0,5 g de la muestra desgrasada se mezcló en 30% solución de metanol, agua ultra pura y se homogenizo en un agitador magnético por un determinado tiempo. El extracto luego se filtró a través de un equipo de filtro al vacío equipo de filtro al vacío (Vacubrand 1c, Alemania). Estos extractos fueron analizados en HPLC y polifenoles totales.

4.10.Análisis de datos

La significancia estadística se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) con nivel de confianza 99% y Duncan; para análisis de datos completo se utilizó el SPSS V. 23 (Statistical Package for the Social Sciences). Para el análisis estadístico se utilizó Microsoff Excel.

V. RESULTADOS

Contenido de polifenoles totales en cacao criollo

Los granos de cacao sometidos a procesos de tostados muestra que el contenido de polifenoles totales varió de acuerdo al tiempo de tostado que fueron sometidos los granos, en el minuto 10 el contenido de polifenoles es de 60,897 mg/g y minuto 50 el contenido de polifenoles es de 31,507 mg/g . Por otro lado, el contenido de polifenoles varió de acuerdo a la temperatura del proceso de tostado, teniendo 63,118 mg/g a una temperatura de 90°C y 24,121 mg/g a 200°C y. Mientras que el contenido de granos sin tratar reportan valores de 110,223± 1,919 mg/g (tabla 3, 4)

Tabla 3. Contenido de (-) - catequina, (-) - epicatequina y polifenoles totales durante el tiempo de tostado (Test de Duncan).

Tiempo (minutos)	(-) Catequinas (mg/g)	(-) Epicatequina (mg/g)	Polifenoles Totales (mg /g)
10	2,980	18,0439	60,897
20	3,293	10,237	45,876
30	3,000	7,319	32,703
40	2,865	7,471	38,224
50	2,444	5,921	31,507

Tabla 4. Composición del contenido de (-) - catequina, (-) - epicatequina y polifenoles totales (Test de Duncan).

Temperatura	(-) Catequinas (mg/g)	(-) Epicatequina (mg/g)	Polifenoles Totales (mg /g)
90°C	2,190	17,917	63,118
110°C	2,443	14,358	55,203
130°C	3,108	14,482	55,441
150°C	3,457	7,754	36,668
170°C	3,882	6,247	32,435
190°C	3,007	3,869	25,904
200°C	2,329	3,961	24,121

Contenido de (-) - Catequina y (-) - epicatequina

Los granos de cacao sometidos a diferentes tratamientos en el proceso de tostado, la (-) - catequina mostró valores de concentración 4,65657 mg/g en temperaturas de 170°C a 30 minutos y valores de 1,59698 mg/g en temperaturas de 200° a 50 minutos. En cuanto a los valores de concentración (-) - epicatequina fueron de 32,54910 mg/g a una temperatura de 130°C en 10 minutos y 0,00 mg/g en 200°C en 50 minutos; perdiéndose por completo los valores de (-) - epicatequina. (Figura 1,2 y 3).

Determinándose que a mayor temperatura y tiempo de tostado mayor serán las pérdidas de estos fenoles. Los picos cromatográficos en las muestras fueron identificados comparando su tiempo de retención y espectro UV con aquellos de los estándares de referencia. La cuantificación se realizó a partir de áreas de los picos de la muestra.

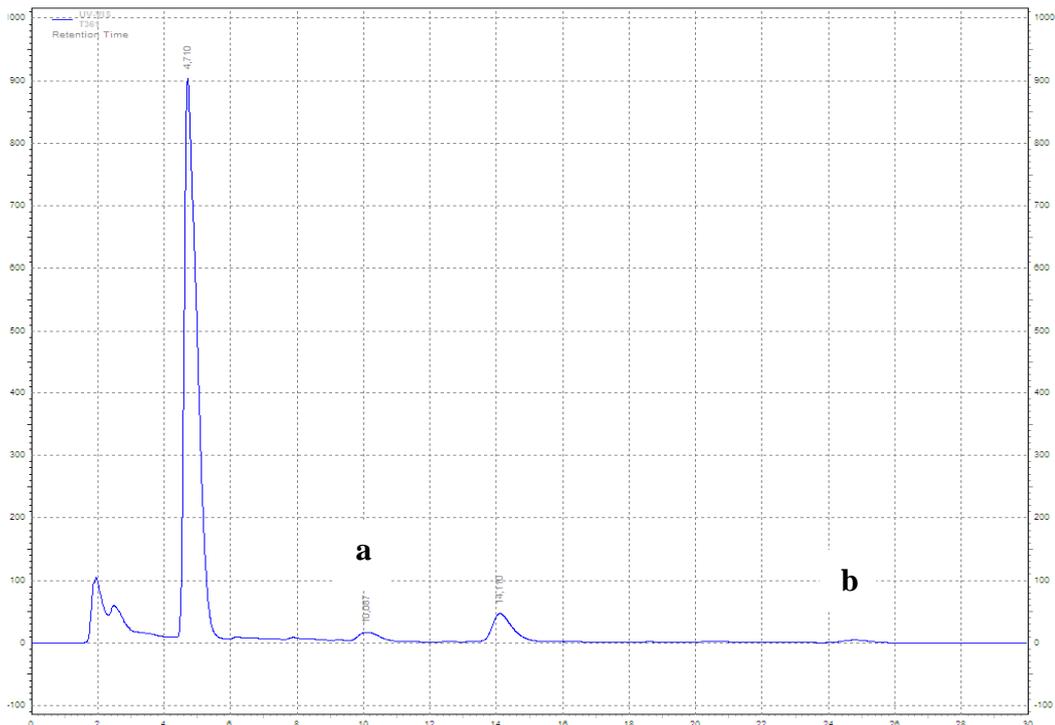


Figura 1. Cromatograma de extracto de cacao tostado, mostrando (-) - catequina (a) y la degradación total de la (-) - epicatequina (b).

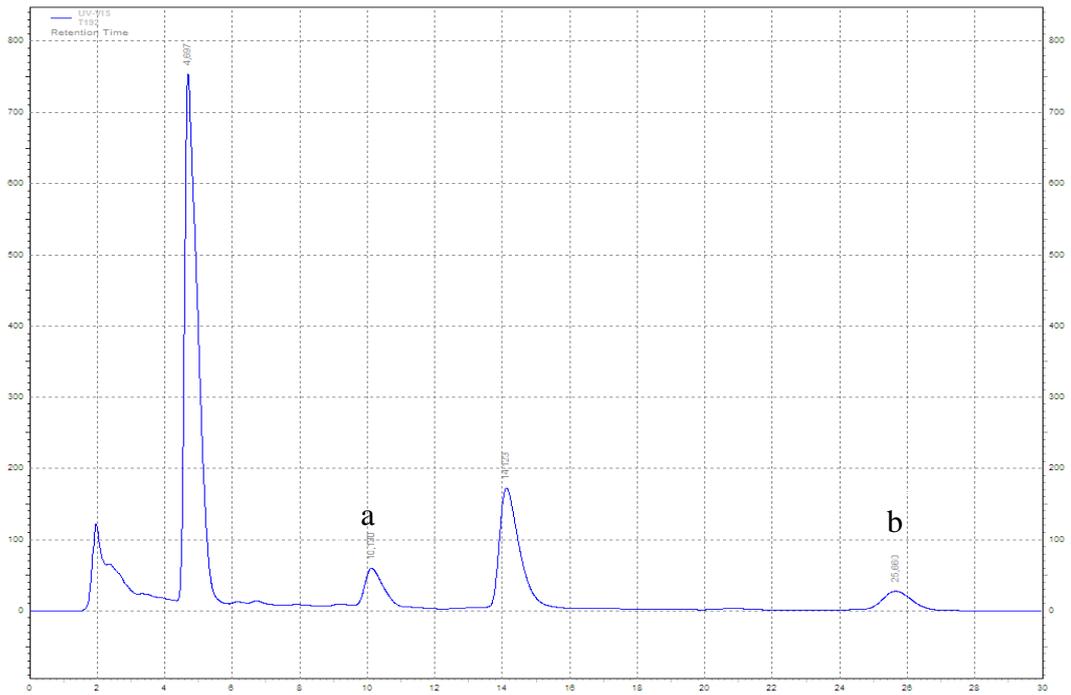


Figura 2. Cromatograma de extracto de cacao tostado, mostrando la mejor concentración de (-) - catequina (a) a una temperatura de 170°C en 30 minutos.

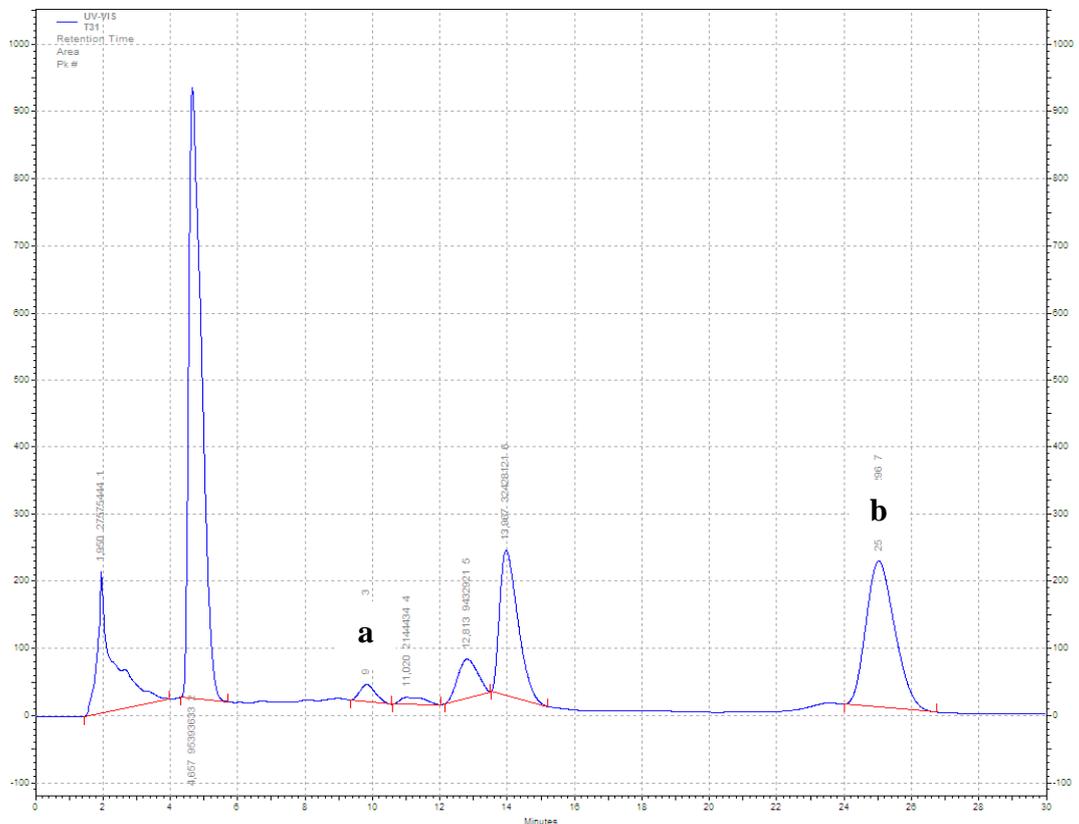


Figura 3. Cromatograma de extracto de cacao tostado, mostrando la mejor concentración de (-) - epicatequina (b) en una temperatura de 130°C en 10 minutos.

Tiempo y temperatura de tostado con mayor contenido de polifenoles

Los tiempos de tostado sobre el mayor contenido de polifenoles se muestran en la tabla 5. Siendo el mayor contenido de polifenoles totales 60,897 mg/g en el minuto 10 de tostado, en la (-) - catequina se tiene con mayor concentración en el minuto 20 con 3,293 mg/g y en (-) – epicatequina en el minuto 10 con 18,043 mg/g. En general conforme aumenta el tiempo de tostado mayor degradación presenta el contenido de polifenoles totales (figura 4) al igual que la (-) - catequina y (-) - epicatequina, (figura 5 y 6).

Tabla 5. Contenido de polifenoles en diferentes tiempos de tostado (Test de Duncan)

Polifenoles totales (mg/g)			
Tiempo (minutos)	Subconjunto		
	1	2	3
50	31,58396		
30	32,70311		
40	38,22457		
20		45,87689	
10			60,89718
(-) - Catequina (mg/g)			
Tiempo (minutos)	Subconjunto		
	1	2	3
50	2,44447		
40		2,86567	
10		2,98098	
30		3,00013	
20			3,29380
(-) - Epicatequina (mg/g)			
Tiempo (minutos)	Subconjunto		
	1	2	3
50	5,92105		
30	7,31954		
40	7,47162		
20		10,23768	
10			18,04397

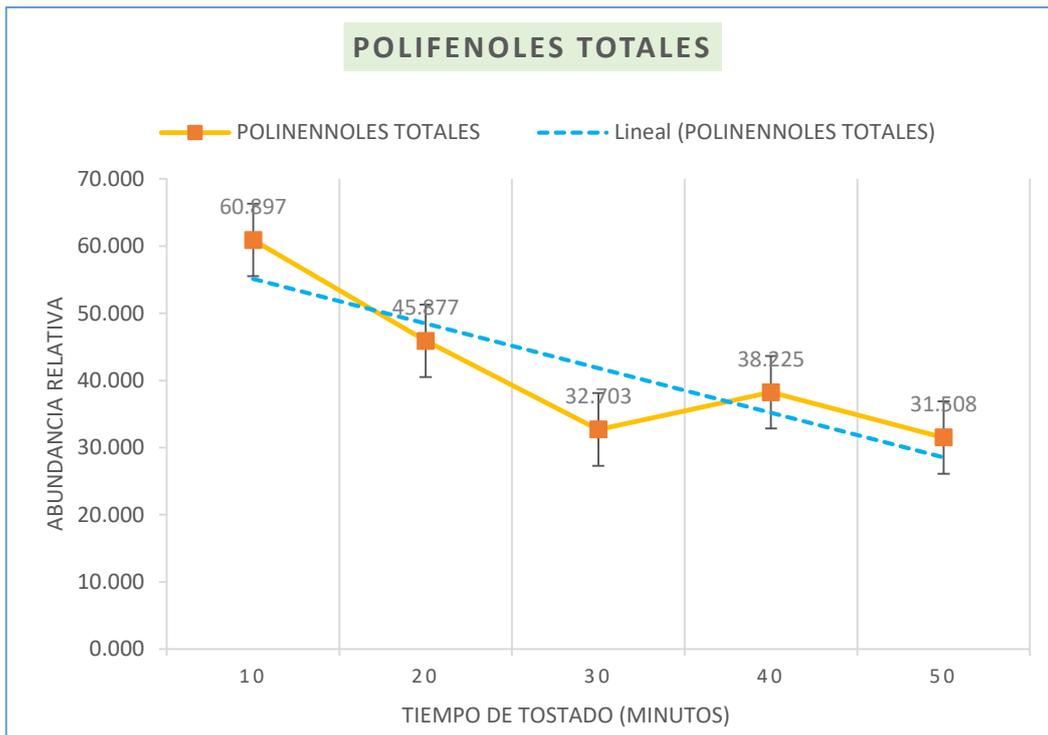


Figura 4. Comportamiento de la curva del contenido de polifenoles totales y su línea de tendencia durante el tiempo de tostado del cacao criollo.

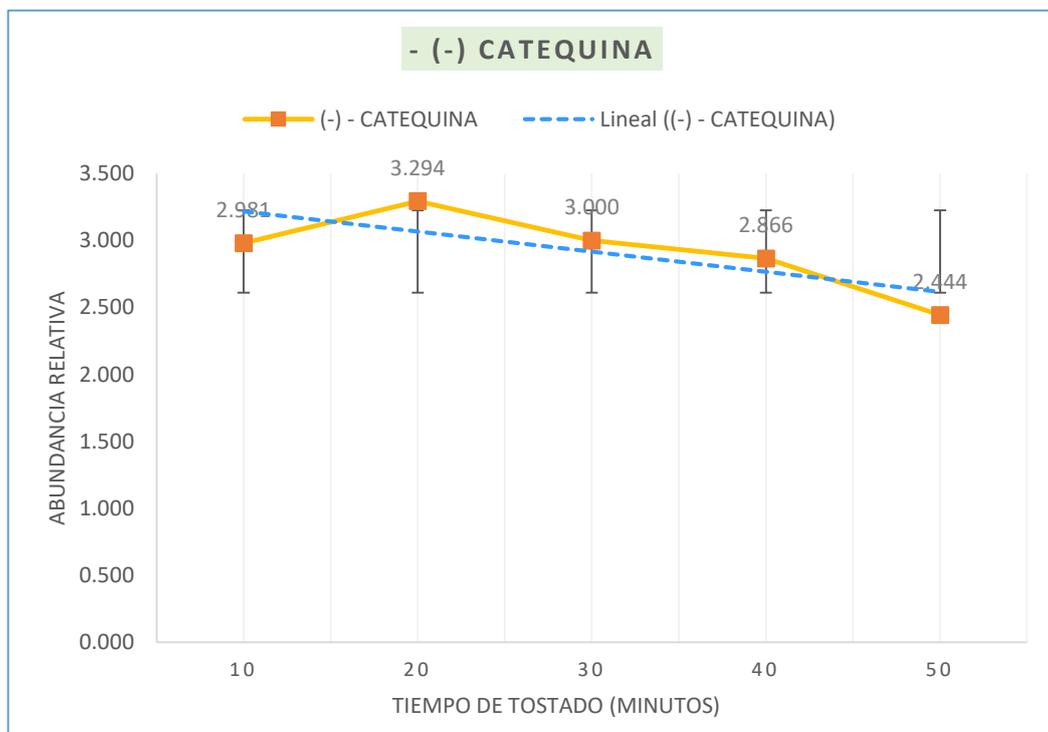


Figura 5. Comportamiento de la curva del contenido de (-) - catequina y su línea de tendencia durante el tiempo de tostado del cacao criollo.

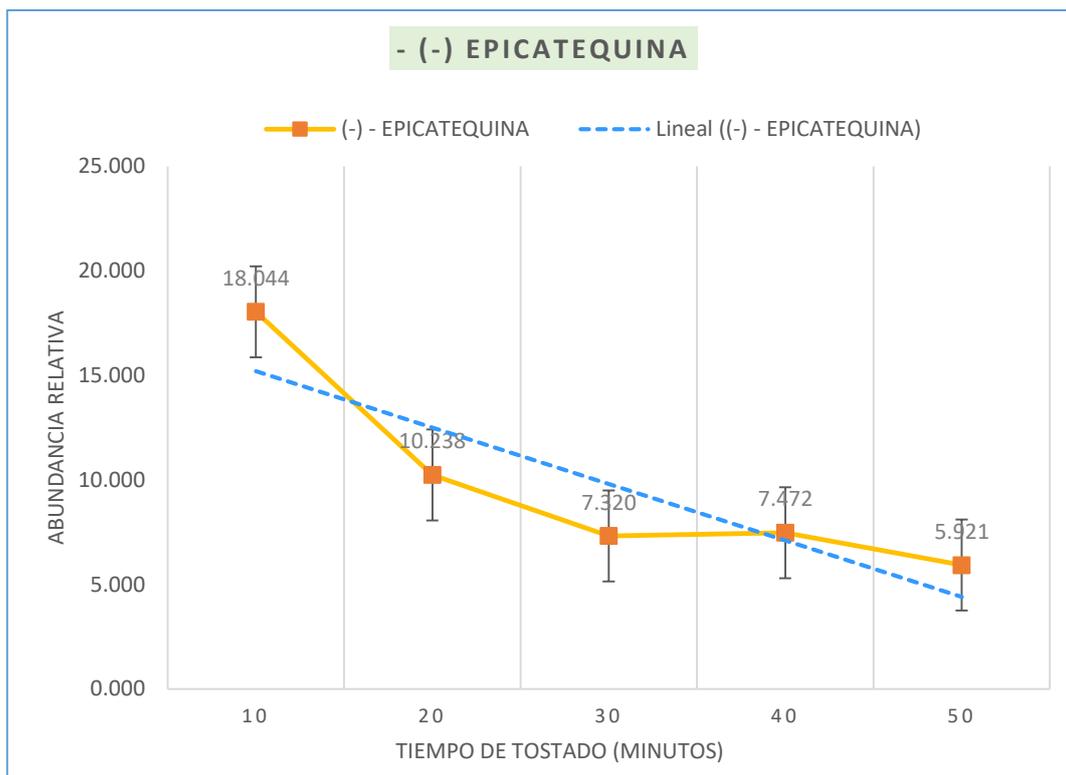


Figura 6. Comportamiento de la curva del contenido de (-) - epicatequina y su línea de tendencia durante el tiempo de tostado del cacao criollo.

De acuerdo a las temperaturas del proceso de tostado se muestra en la tabla 4 mayor contenido de polifenoles totales está a 90 °C con 63,118 mg/g, en (-) - catequina se encuentra la mayor concentración a 170 °C con 3,882 mg/g y en (-) - epicatequina la mayor concentración está a 90°C con 17,917 mg/g.

El contenido de fenoles totales y (-) - epicatequina presentan mayor degradación conforme incrementa la temperatura (figura 7 y 8), mientras que (-) -catequina aumenta su contenido, conforme incrementa la temperatura de tostado (figura 9).

Tabla 6. Contenido de polifenoles en las diferentes temperaturas de tostado (Test de Duncan)

Polifenoles totales (mg/g)			
Temperatura (° C)	Subconjunto		
	1	2	3
200	24,12170		
190	26,01165		
170	32,43505		
150		36,66830	
110			55,20335
130			55,44165
90			63,11830

(-)- Catequina (mg/g)			
Temperatura (° C)	Subconjunto		
	1	2	3
90	2,19072		
200	2,32996		
110	2,44351		
190		3,00716	
130		3,10827	
150		3,10827	
170			3,88213

(-)-Epicatequina (mg/g)			
Temperatura (° C)	Subconjunto		
	1	2	3
190	3,86934		
200	3,96106		
170	6,24766		
150		7,75487	
110			14,35803
130			14,48296
90			17,91750

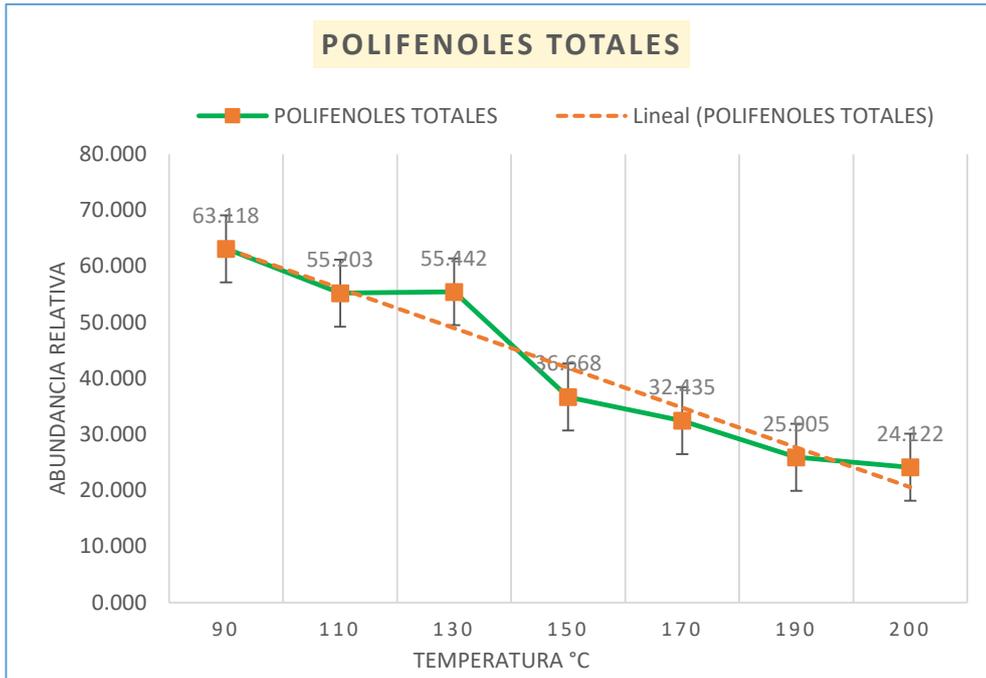


Figura 7. Degradación del contenido de fenoles totales durante la temperatura de tostado del cacao criollo

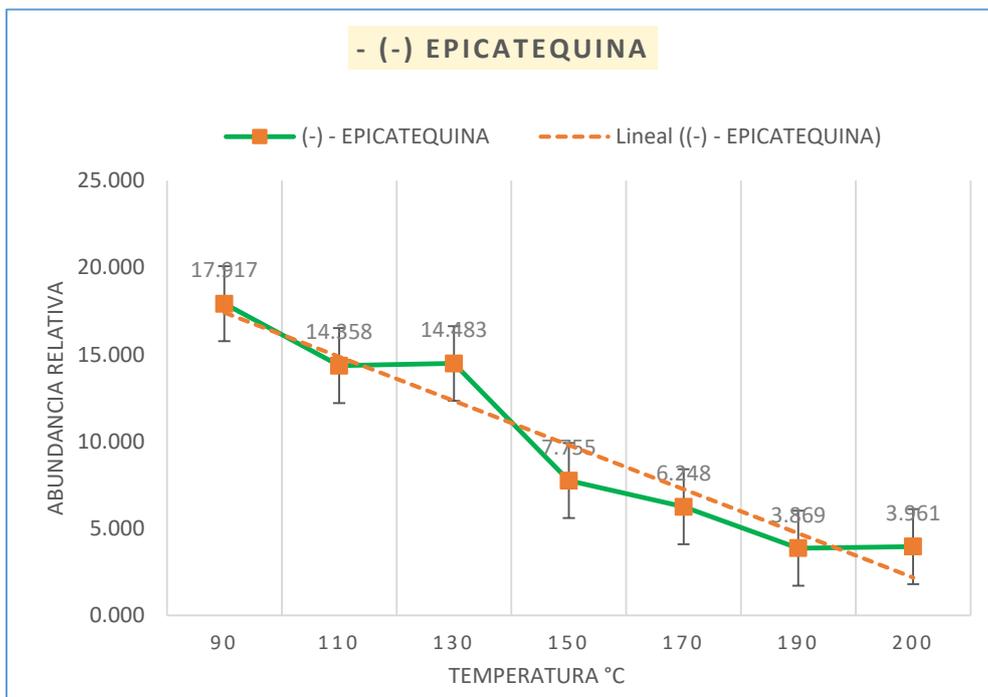


Figura 8. Degradación del contenido de (-) - epicatequina durante la temperatura de tostado del cacao criollo.

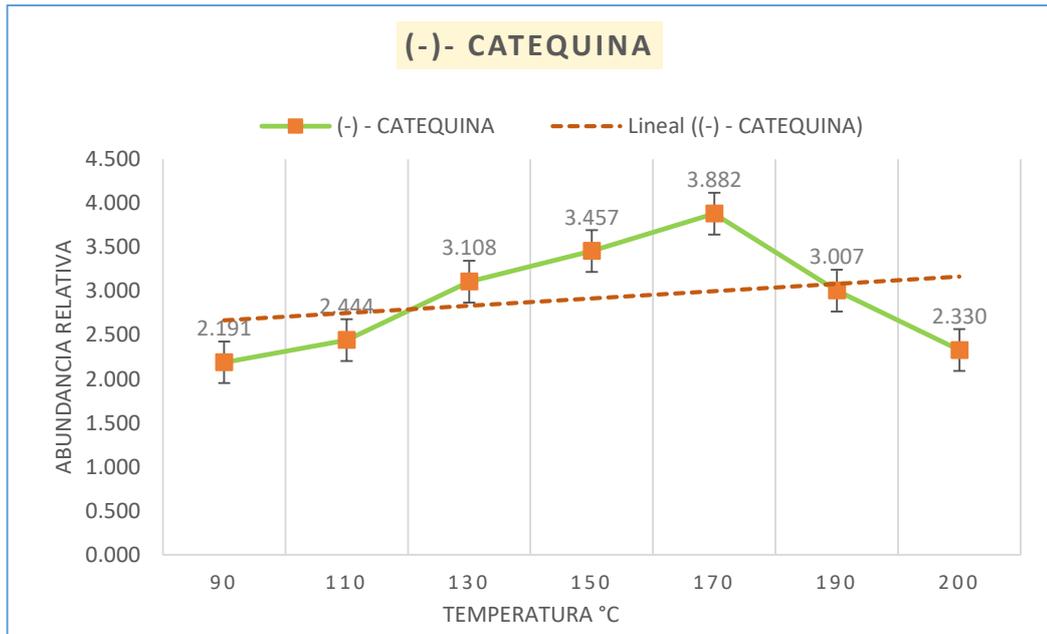


Figura 9. Evolución del contenido de (-) - catequina y su línea de tendencia durante la temperatura de tostado del cacao criollo.

En la figura 10 se aprecia las líneas de tendencia desde una concentración mayor de polifenoles totales a diferentes temperaturas y tiempo, presentándose una tendencia de degradación desde los puntos iniciales de los tratamientos hasta incrementar la degradación conforme se incrementen la temperatura y tiempo del proceso de tostado.

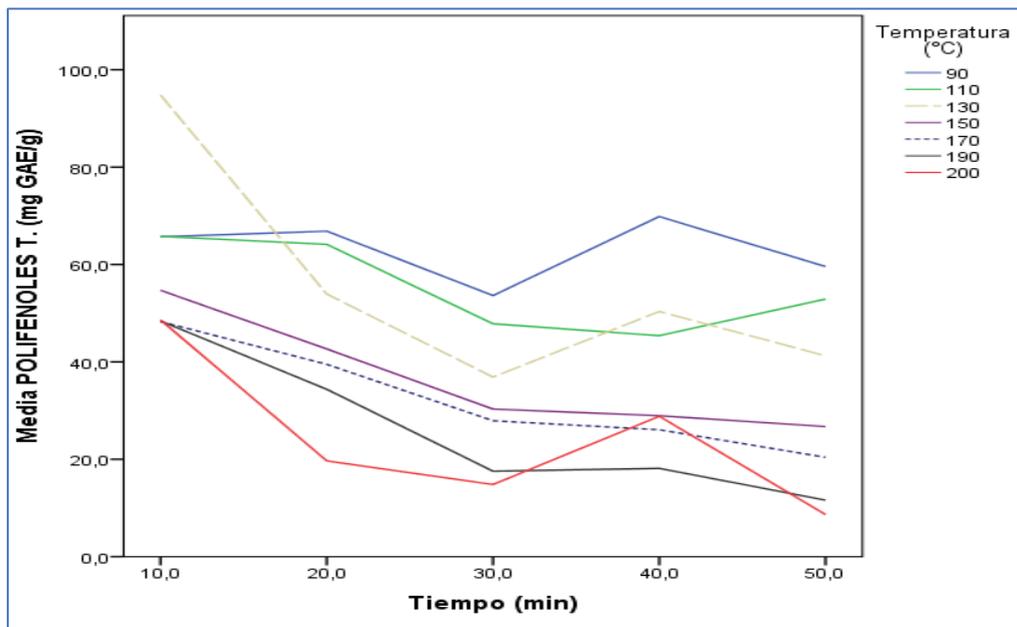


Figura 10. Degradación de polifenoles totales en relación del tiempo y temperatura.

De acuerdo a la figura 11 la concentración de (-) – epicatequina a diferentes temperaturas y tiempo, presentan una tendencia de degradación desde los puntos iniciales de los tratamientos hasta incrementar la degradación conforme se incrementen la temperatura y tiempo del proceso de tostado. Considerando que en que a menor grado de temperatura mayor será el contenido de (-) – epicatequina; y a mayor grado de temperaturas y tiempo de tostado las concentraciones de (-) – epicatequina se pierden hasta en su totalidad.

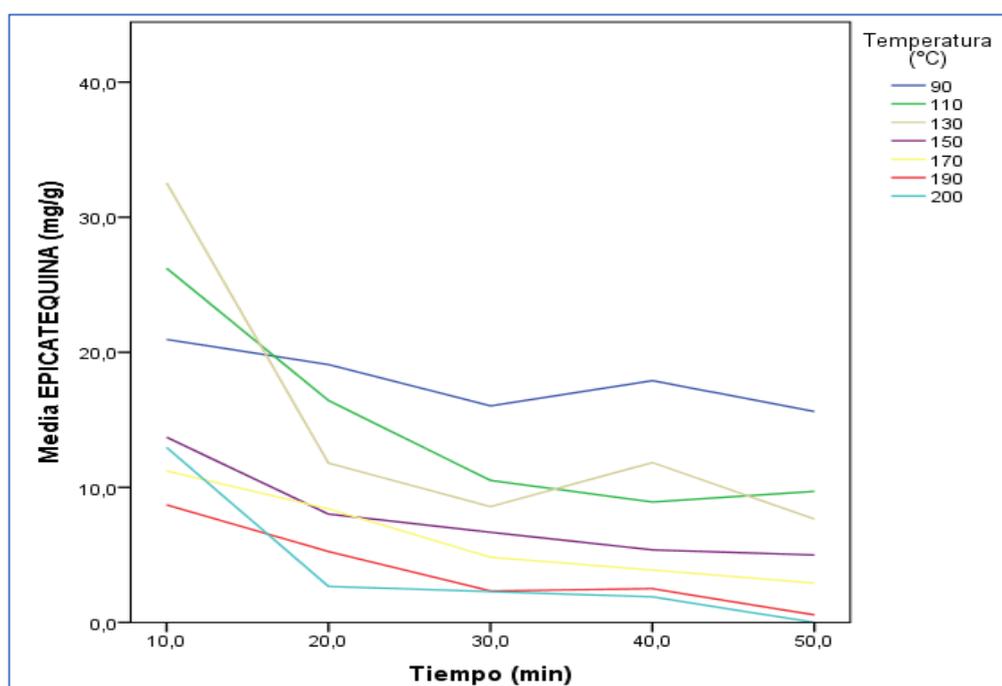


Figura 11. Degradación de (-) - epicatequina a diferentes temperaturas y tiempo de tostado.

Cinética de polifenoles

La figura 12 muestra los resultados de (-) - catequina, (-) - epicatequina y polifenoles totales de acuerdo al tiempo de tostado. Mostrando una degradación descendente de los polifenoles totales, (-) - epicatequina y (-) - catequina conforme aumenta el tiempo de tostado, pero en el minuto 30 en la curva de polifenoles totales se genera un ligero incremento hasta el minuto 40 donde vuelve a descender la curva. (-) - epicatequinas y (-) - catequinas tiene mayor degradación que los polifenoles totales.

Por otro lado en la figura 13 se muestra la cinética de la degradación de los fenoles totales, (-) - epicatequina y (-) - catequina durante la temperatura del proceso de tostado. En la que

las curvas de polifenoles totales y (-)- epicatequina presentan una degradación constante conforme incrementa la temperatura de tostado. Mientras (-)- catequina reporta una curva ascendente con mayor concentración a 170 °C.

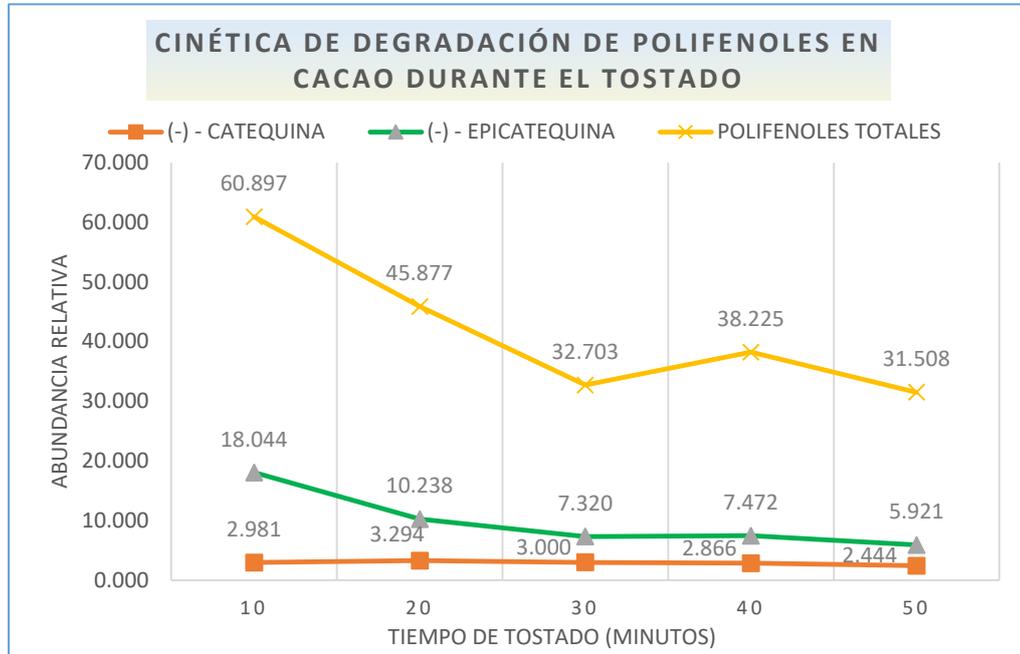


Figura 12. Evolución de la curva cinética de la degradación de los polifenoles totales, (-) – catequina, (-) - epicatequina durante el tiempo de tostado.

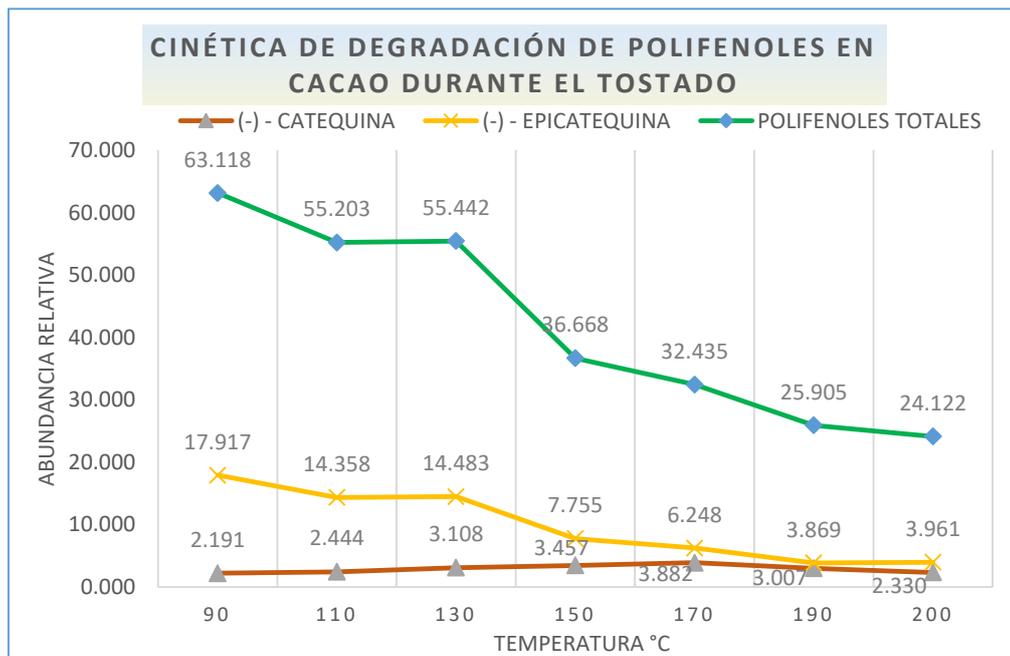


Figura 13. Evolución de la curva cinética de la degradación de polifenoles, (-) – catequina y (-) epicatequina durante la temperatura de tostado.

VI. DISCUSIÓN

La muestra sin tostar, tuvo un contenido elevado de polifenoles ($110,223 \pm 1,919$ mg/g), en comparación a reportes de otras investigaciones (34 a 60 mg/g) para granos de cacao (Ramli, Yatim, Said, y Hok, 2001). La diferencia puede atribuirse a las variedades estudiadas; puesto que el factor genético es preponderante en las características del grano (Diab et al., 2014).

El contenido de polifenoles totales se redujo significativamente en función a la temperatura y el tiempo. Tal como indica Redovniković et al. (2009), las condiciones de proceso influyen en el contenido de moléculas antioxidantes. Este fenómeno se debe principalmente a procesos oxidativos cuando se incrementa la temperatura hasta valores muy elevados (Alean et al., 2016; Schinella et al., 2010).

También, se ha encontrado que la concentración de (-) – epicatequina y la (-) – catequina se modifica, cuando los granos son sometidos a altas temperaturas y por tiempos prolongados. La (-) – epicatequina se reduce hasta degradarse completamente; sin embargo, la (-) – catequina se incrementa hasta los 170 °C y 20 min para luego reducirse. Este comportamiento fue observado por Kofink, Papagiannopoulos, y Galensa (2007), quienes en el procesamiento de tostado observaron que se genera un nuevo estereoisómero, (-)- catequina, que no se encuentra en los granos de cacao fresco; también, Payne et al. (2010), observaron cambios similares aunque los puntos de inflexión se encontraron a menores temperaturas.

La temperatura inicial de estudio fue de 90 °C, sin embargo otros estudios indican que incluso a temperaturas inferiores (70 °C) ya se puede observar degradación de los polifenoles (Misnawi, Jinap, Jamilah, & Nazamid, 2004a).

En consecuencia, lo encontrado en ésta investigación, confirma lo reportado en otros estudios, con otros tipos de cacao (distintos al cacao criollo fino de aroma), en el que se evidencia una relación entre la temperatura y el tiempo de tostado, con los antioxidantes, olores y sabores (Misnawi, Jinap, Jamilah, & Nazamid, 2004b).

VII. CONCLUSIONES

El contenido de polifenoles en granos de cacao, se ve afectado por el proceso de tostado.

Determinándose los mejores concentraciones de polifenoles totales en temperatura de 130°C en un tiempo de 10 minutos, (-) - catequinas a 170°C en un tiempo de 30 minutos y en (-) - epicatequina a 130 °C durante 10 minutos de tostado.

En la degradación de polifenoles la temperatura tiene mayor influencia que el tiempo de tostado. Siendo así que la temperatura es un factor determinante en el contenido de polifenoles, si la temperatura aumenta, el contenido de polifenoles disminuye.

El incremento de la temperatura de tostado causa un incremento en el contenido de (-) - catequina posiblemente debido a la eperimización de - (-) catequina.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios más óptimos para determinar todos los polifenoles posibles en diferentes variedades de granos de cacao de Amazonas durante el tostado.

Realizar estudios de la relación que existe entre -(-) catequina y -(-) epicatequina durante el tostado.

Realizar estudios para determinar los contenidos de polifenoles en granos de cacao fermentados de los diferentes lugares de Amazonas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackar, D., Valek Lendie, K., Valek, M., Subarie, D., Milicevie, B., Babie, J., & Nedie, I. (2013). Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food? *Journal of Chemistry*, 2013, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/289392>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840-857. <https://doi.org/10.1080/10408390701719272>
- Alean, J., Chejne, F., & Rojano, B. (2016). Degradation of polyphenols during the cocoa drying process. *Journal of Food Engineering*, 189, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.026>
- Álvarez, C., Pérez, E., Boulanger, R., Lares, M., Ssemat, As., Davrieux, F., & Cros, E. (2012). Identificación De Los Compuestos Aromáticos En El Cacao Criollo De Venezuela Usando Microextracción En Fase Sólida Y Cromatografía De Gases, 4.
- Aprotosoai, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview: Flavor chemistry of cocoa *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73-91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- Ascrizzi, R., Flamini, G., Tessieri, C., & Pistelli, L. (2017). From the raw seed to chocolate: Volatile profile of Blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchemical Journal*, 133(Supplement C), 474-479. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.024>
- Beckett, S. T. (Ed.). (2009). *Industrial chocolate manufacture and use* (4th ed). Chichester, U.K. ; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Calderón, J. M. H., Hidalgo, J. C. G., Tello, P. C., Olivares, L. R., Romero, C. A., Vargas, E. U., & Reátegui, J. M. A. (s. f.). Situación Actual y Perspectivas en el Mercado Nacional e Internacional al 2015, 90.
- Caligiani, A., Cirlini, M., Palla, G., Ravaglia, R., & Arlorio, M. (2007). GC-MS detection of chiral markers in cocoa beans of different quality and geographic origin. *Chirality*, 19(4), 329-334. <https://doi.org/10.1002/chir.20380>

- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, *60*, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019>
- Diab, J., Hertz-Schünemann, R., Streibel, T., & Zimmermann, R. (2014). Online measurement of volatile organic compounds released during roasting of cocoa beans. *Food Research International*, *63*, 344-352. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.047>
- Djikeng, F. T., Teyomnou, W. T., Tenyang, N., Tiencheu, B., Morfor, A. T., Touko, B. A. H., ... Womeni, H. M. (2018a). Effect of traditional and oven roasting on the physicochemical properties of fermented cocoa beans. *Heliyon*, *4*(2), e00533. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00533>
- Djikeng, F. T., Teyomnou, W. T., Tenyang, N., Tiencheu, B., Morfor, A. T., Touko, B. A. H., ... Womeni, H. M. (2018b). Effect of traditional and oven roasting on the physicochemical properties of fermented cocoa beans. *Heliyon*, *4*(2), e00533. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00533>
- D'Souza, R. N., Grimbs, S., Behrends, B., Bernaert, H., Ullrich, M. S., & Kuhnert, N. (2017). Origin-based polyphenolic fingerprinting of *Theobroma cacao* in unfermented and fermented beans. *Food Research International*, *99*, 550-559. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.007>
- Hu, Y., Pan, Z. J., Liao, W., Li, J., Gruget, P., Kitts, D. D., & Lu, X. (2016). Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, *202*, 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.130>
- Hurst, W. J., Krake, S. H., Bergmeier, S. C., Payne, M. J., Miller, K. B., & Stuart, D. A. (2011). Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cocoa beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal*, *5*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-53>
- Jonfia-Essien, W. A., West, G., Alderson, P. G., & Tucker, G. (2008). Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry*, *108*(3), 1155-1159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.001>

- Kofink, M., Papagiannopoulos, M., & Galensa, R. (2007). (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer. *Molecules*, 12(7), 1274-1288. <https://doi.org/10.3390/12071274>
- Krysiak, W. (2006). Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 449-453. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.07.013>
- MINAGRI (2012). Catálogo de cacao del Perú 3° Edición Lima, Perú
- Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2004a). Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry*, 85(1), 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.005>
- Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2004b). Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Quality and Preference*, 15(5), 403-409. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00097-1)
- Payne, M. J., Hurst, W. J., Miller, K. B., Rank, C., & Stuart, D. A. (2010). Impact of Fermentation, Drying, Roasting, and Dutch Processing on Epicatechin and Catechin Content of Cacao Beans and Cocoa Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10518-10527. <https://doi.org/10.1021/jf102391q>
- Ponce, S. L. D., & Chang, M. H. P. (2012). Previo a la obtención del Título de:, 145.
- Portillo, E. (2006). Efecto de algunos factores post-cosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Fac. Agron.*, 9.
- Quiñones, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, (1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Radojčić Redovniković, I., Delonga, K., Mazor, S., Dragović-Uzelac, V., Carić, M., & Vorkapić-Furač, J. (2009). Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(No. 5), 330-337. <https://doi.org/10.17221/119/2008-CJFS>
- Ramli, N., Hassan, O., Said, M., Samsudin, W., & Idris, N. A. (2006). Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(3), 280–298.

- Ramli, N., Yatim, A. M., Said, M., & Hok, H. C. (2001). HPLC Determination of Methylxanthines and Polyphenols Levels In Cocoa and Chocolate Products, 10.
- Region Amazonas Presentara Cacao “Aroma y Sabor Nativo de los Dioses Para El Mundo. (s. f.). Recuperado 25 de septiembre de 2018, de http://perumagazin.com/index.php?option=com_content&view=article&id=333:region-amazonas-presentara-cacao-aroma-y-sabor-nativo-de-los-dioses-para-el-mundo&catid=43:articulos&Itemid=60
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010a). Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61(1), 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.008>
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010b). Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61(1), 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.008>
- Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M. Á., Mugerza, B., Ramón, D., & Ríos, J. L. (2010). Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43(6), 1614-1623. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.032>
- Sotelo C., L., Alvis B., A., & Arrázola P., G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124. <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751>
- Suazo, Y., Davidov-Pardo, G., & Arozarena, I. (2014a). Effect of Fermentation and Roasting on the Phenolic Concentration and Antioxidant Activity of Cocoa from Nicaragua: Effect of Process on Cocoa from Nicaragua. *Journal of Food Quality*, 37(1), 50-56. <https://doi.org/10.1111/jfq.12070>
- Suazo, Y., Davidov-Pardo, G., & Arozarena, I. (2014b). Effect of Fermentation and Roasting on the Phenolic Concentration and Antioxidant Activity of Cocoa from Nicaragua: Effect of Process on Cocoa from Nicaragua. *Journal of Food Quality*, 37(1), 50-56. <https://doi.org/10.1111/jfq.12070>
- Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao,

mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma, 17.

Wang, H., Helliwell, K., & You, X. (2000). Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, 7.

ANEXOS

Tabla 7. Contenido de catequina, epicatequina y polifenoles totales en sus diferentes tratamientos de tostado.

N°	Tiempo	Temperatura	(-) - Catequinas (mg/g)	(-) - Epicatequina (mg/g)	Polifenoles Totales (mg/g)
1	10	90	2,560	14,136	66,940
2	10	90	0 ,000	0,000	98,973
3	10	90	2,317	16,647	50,340
4	10	90	3,165	53,006	46,507
5	10	110	2,515	23,185	64,740
6	10	110	2,380	27,396	57,473
7	10	110	2,657	27,672	72,807
8	10	110	2,612	26,649	68,073
9	10	130	2,762	27,771	82,607
10	10	130	3,030	29,649	100,307
11	10	130	2,981	43,965	90,440
12	10	130	3,024	28,813	105,807
13	10	150	2,606	10,835	78,707
14	10	150	2,393	9,377	39,340
15	10	150	3,169	13,527	54,940
16	10	150	2,872	21,092	45,840
17	10	170	2,919	7,876	49,840
18	10	170	4,863	14,040	66,840
19	10	170	2,919	13,266	34,740
20	10	170	4,615	9,680	41,707
21	10	190	2,618	12,234	70,240
22	10	190	4,195	16,140	50,273
23	10	190	2,155	6,445	40,140
24	10	190	4,181	0,000	32,973
25	10	200	3,828	8,224	95,140
26	10	200	3,281	7,158	31,140
27	10	200	4,375	27,546	36,007
28	10	200	2,476	8,903	32,240
29	20	90	2,414	20,383	64,840
30	20	90	2,498	23,001	49,307
31	20	90	2,277	14,315	79,640
32	20	90	2,514	18,652	73,607
33	20	110	2,685	14,831	74,040
34	20	110	2,877	15,703	59,807
35	20	110	2,451	15,559	66,873
36	20	110	3,120	19,624	55,840

37	20	130	2,605	13,548	59,040
38	20	130	4,497	11,032	49,240
39	20	130	2,276	10,079	51,140
40	20	130	3,194	12,531	56,340
41	20	150	2,732	9,371	24,273
42	20	150	4,029	8,767	45,273
43	20	150	2,116	5,986	43,007
44	20	150	3,709	7,974	58,073
45	20	170	4,816	7,305	57,707
46	20	170	4,862	7,077	25,073
47	20	170	4,300	13,359	38,440
48	20	170	3,490	5,873	36,773
49	20	190	4,610	6,217	36,273
50	20	190	4,835	5,665	22,973
51	20	190	3,785	3,905	32,640
52	20	190	5,165	5,224	45,607
53	20	200	2,611	2,613	19,840
54	20	200	2,276	2,447	18,507
55	20	200	2,012	2,206	26,740
56	20	200	3,468	3,408	13,640
57	30	90	2,252	12,783	53,673
58	30	90	2,788	28,790	39,140
59	30	90	2,073	10,423	79,207
60	30	90	2,272	12,140	42,473
61	30	110	2,841	11,957	48,273
62	30	110	2,303	11,052	34,540
63	30	110	2,340	11,407	52,507
64	30	110	2,183	7,635	55,973
65	30	130	2,779	9,759	41,507
66	30	130	2,987	10,309	32,973
67	30	130	2,350	5,883	37,307
68	30	130	2,722	8,345	35,740
69	30	150	5,130	6,892	27,307
70	30	150	4,625	7,748	31,773
71	30	150	3,586	5,841	28,873
72	30	150	3,167	6,226	33,307
73	30	170	3,167	3,070	17,173
74	30	170	4,208	4,879	38,607
75	30	170	6,371	6,192	26,107
76	30	170	4,881	5,163	29,773
77	30	190	2,729	3,000	6,140
78	30	190	2,541	2,566	25,807
79	30	190	3,029	3,753	16,907

80	30	190	1,833	0,000	21,340
81	30	200	2,335	2,363	13,240
82	30	200	2,077	2,172	14,307
83	30	200	2,214	2,345	13,740
84	30	200	2,220	2,254	17,973
85	40	90	2,538	32,850	93,040
86	40	90	2,074	12,001	47,073
87	40	90	2,039	8,555	84,607
88	40	90	2,586	18,204	54,673
89	40	110	2,262	10,814	41,307
90	40	110	2,204	7,749	53,107
91	40	110	2,029	7,268	37,107
92	40	110	2,533	9,833	50,007
93	40	130	3,405	15,958	35,607
94	40	130	2,900	9,199	47,173
95	40	130	4,397	12,067	68,373
96	40	130	3,596	10,127	50,273
97	40	150	3,607	5,789	32,140
98	40	150	3,741	5,578	32,873
99	40	150	3,559	4,339	21,973
100	40	150	4,906	5,777	28,807
101	40	170	3,261	4,036	10,307
102	40	170	2,841	3,019	38,707
103	40	170	4,564	4,808	23,907
104	40	170	3,717	3,646	31,373
105	40	190	2,590	2,581	13,107
106	40	190	2,968	2,706	22,107
107	40	190	2,427	2,378	17,973
108	40	190	2,456	2,342	19,340
109	40	200	1,887	2,105	13,540
110	40	200	2,128	2,470	16,540
111	40	200	0,000	0,000	13,140
112	40	200	3,022	3,006	72,107
113	50	90	2,441	16,771	44,273
114	50	90	2,528	21,207	59,140
115	50	90	2,478	13,542	83,573
116	50	90	0,000	10,944	51,340
117	50	110	2,710	9,058	51,340
118	50	110	2,126	14,175	34,840
119	50	110	1,923	5,545	62,473
120	50	110	2,118	10,048	62,940
121	50	130	3,089	7,212	40,873
122	50	130	3,808	7,852	33,840

123	50	130	3,061	5,879	40,573
124	50	130	2,700	9,684	49,673
125	50	150	3,382	5,044	22,207
126	50	150	4,168	7,183	26,707
127	50	150	2,970	3,976	28,773
128	50	150	2,677	3,775	29,173
129	50	170	2,699	2,946	20,707
130	50	170	2,286	2,315	19,240
131	50	170	3,427	3,307	23,007
132	50	170	3,438	3,096	18,673
133	50	190	1,980	0,000	10,807
134	50	190	1,870	0,000	12,640
135	50	190	2,114	2,231	9,473
136	50	190	2,063	0,000	13,473
137	50	200	2,289	0,000	8,673
138	50	200	0,000	0,000	8,473
139	50	200	1,891	0,000	8,540
140	50	200	2,207	0,000	8,907

Datos obtenidos en los diferentes tratamientos

Tabla 8. Concentraciones de polifenoles totales, (-) - catequinas, (-) - epicatequinas y polifenoles totales sin tratamientos.

Nº	Sin Tratamientos	-(-) Catequinas (mg/g)	-(-) Epicatequina (mg/g)	Polifenoles T. (mg/g)
1	Blanco	3,108	42,229	111,940
2	Blanco	2,858	31,262	107,940
3	Blanco	2,616	30,490	109,340
4	Blanco	2,644	29,105	111,673

Tabla 9. Análisis de varianza

Origen		Tipo III de suma de cuadros	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo Corregido	Catequinas	88,107 ^a	34	2,591	5,034	.000
	Epicatequina (Mg/G)	7479,741 ^b	34	219,992	7,380	.000
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	52269,867 ^c	34	1537,349	8,869	.000
Intersección	Catequinas (Mg/G)	1191,252	1	1191,252	2314,066	.000
	Epicatequina (Mg/G)	13442,233	1	13442,233	450,960	.000
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	245282,857	1	245282,857	1414,981	.000
Tiempo	Catequinas (Mg/G)	10,609	4	2,652	5,152	.001
	Epicatequina (Mg/G)	2653,696	4	663,424	22,257	.000
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	16273,922	4	4068,480	23,470	.000
Temperatura	Catequinas (Mg/G)	47,288	6	7,881	15,310	.000
	Epicatequina (Mg/G)	3893,342	6	648.890	21,769	.000
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	29920,448	6	4986,741	28,767	.000
Tiempo * Temperatura	Catequinas (Mg/G)	30,209	24	1,259	2,445	.001
	Epicatequina (Mg/G)	932,704	24	38,863	1,304	.180
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	6075,497	24	253,146	1,460	.098
Error	Catequinas (Mg/G)	54,053	105	.515		
	Epicatequina (Mg/G)	3129,844	105	29,808		
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	18201,449	105	173,347		
Total	Catequinas (Mg/G)	1333,411	140			

	Epicatequina (Mg/G)	24051,819	140			
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	315754,173	140			
Total Corregido	Catequinas (Mg/G)	142,159	139			
	Epicatequina (Mg/G)	10609,586	139			
	Polifenoles T. (Mg Gae/G)	70471,316	139			

- a. R al cuadrado = ,620 (R al cuadrado ajustada = ,497)
- b. R al cuadrado = ,705 (R al cuadrado ajustada = ,609)
- c. R al cuadrado = ,742 (R al cuadrado ajustada = ,658)



Figura 14. Pesado de 100g de muestras de cacao criollo para ser tostados.



Figura 15. Tostado de 100g de cacao criollo de Amazonas.



Figura 16. Muestras tostadas con su respectiva rotulación.



Figura 17. Polvo de cacao listo para ser desgrasados.



Figura 18. Viales con concentración de ácido gálico para crear una curva de calibración.

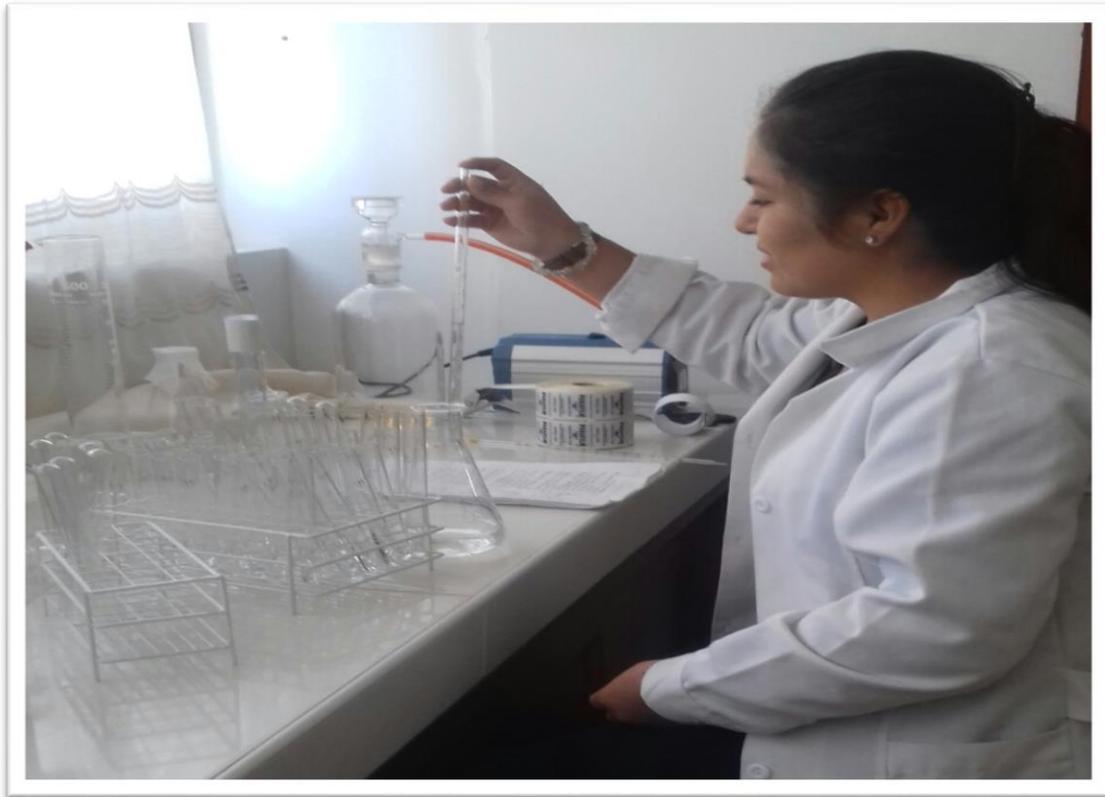


Figura 19. Preparando las muestras para la lectura de polifenoles totales en spectrophotometer

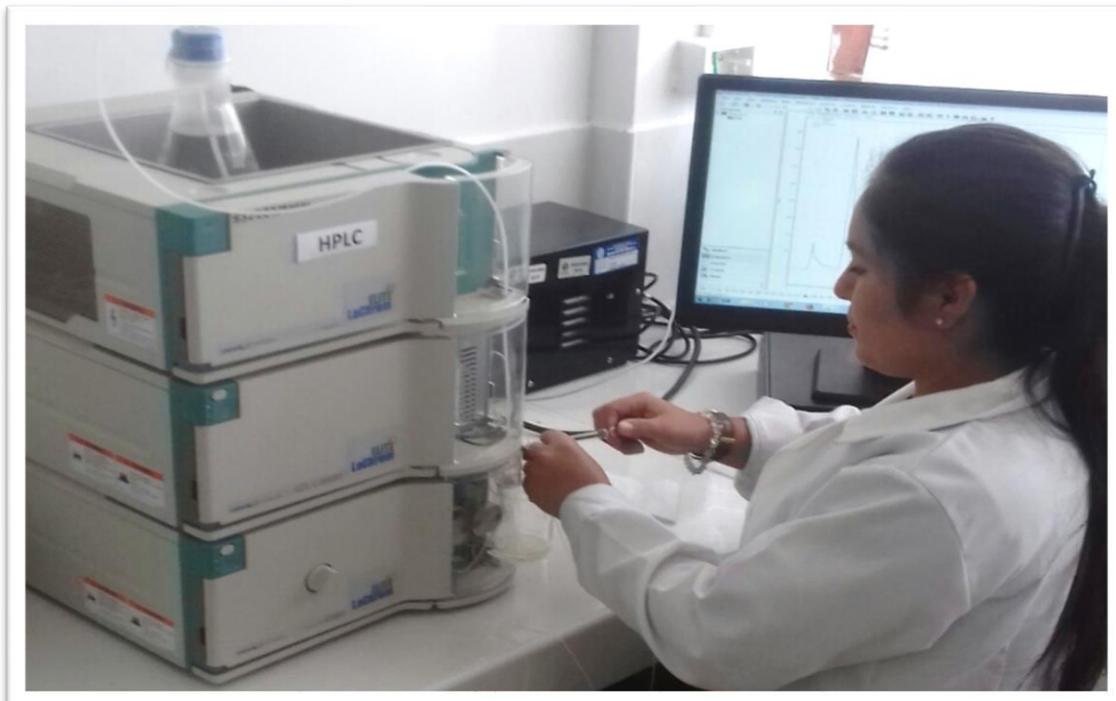


Figura 20. Inyección de muestra al HPLC.



Figura 21. Muestras para la lectura de polifenoles totales en espectrofotometro

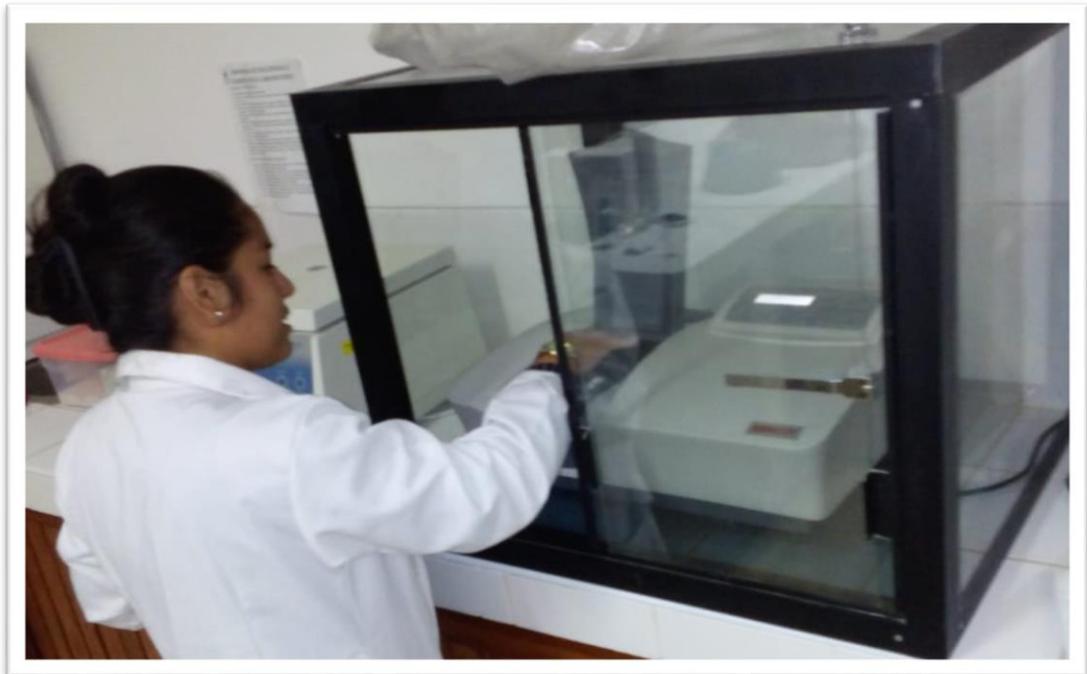


Figura 22. Lectura de polifenoles totales en el equipo espectrofotometro.