

Efecto del Tostado Sobre los Metabolitos Secundarios y la Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano

Effect of Roasting on the Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of Colombian Cocoa Clones
Sandra Zapata Bustamante¹; Angélica Tamayo Tenorio² y Benjamín Alberto Rojano³

Resumen. El tostado es una de las operaciones tecnológicas más importantes en el procesamiento de los granos de cacao; este proceso conduce a la formación de los productos de la reacción de Maillard (RM) los cuales son cruciales para el desarrollo de la calidad organoléptica de los granos de cacao y sus productos asociados. En el presente estudio se evaluó el efecto del tostado sobre el contenido de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante en cinco clones de cacao cultivados en Colombia. En los extractos metanólicos de los diferentes clones de cacao se determinó el contenido de fenoles totales, taninos condensados, antocianinas totales, catequina y epicatequina, teobromina y cafeína. Además, se determinó la actividad antioxidante por medio de la actividad atrapadora del radical ABTS^{•+}, el método ORAC y la capacidad atrapadora de radicales superóxido. En conclusión, el efecto del tostado en los clones de cacao no tuvo un comportamiento uniforme sobre los cambios en los contenidos de los diversos metabolitos secundarios y la actividad antioxidante.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, alcaloides, capacidad atrapadora de radicales libres, ORAC.

Abstract. Roasting is one of the most important technological operations in the processing of cocoa beans; this process leads to the formation of products of the Maillard reaction (RM), which are crucial for the development of organoleptic quality of cocoa beans and its associated products. The aim of this study was to evaluate the effect of roasting on the content of secondary metabolites and antioxidant activity in five Colombian cocoa clones, by different methodologies. The methanolic extracts of the cocoa beans were analyzed for total phenols content, condensed tannins, total antocyanins, catechin and epicatechin, theobromine and caffeine. The antioxidant activity was determined by ABTS assay, ORAC method and superoxide radical scavenging method. The effect of roasting on cocoa clones did not have an unspecified behavior. In conclusion, the effect of roasting of cocoa clones was not uniform on the various contents of secondary metabolites and antioxidant activity.

Key words: Phenolic Compounds, alkaloids, free-radical scavenging activity, ORAC.

Los alimentos como frutas, vegetales y granos contienen una alta variedad de compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes, que han recibido gran atención debido a sus funciones fisiológicas como antimutagénicos y antimicrobianos (Amin *et al.*, 2004; Othman *et al.*, 2007; Jonfia-Essien *et al.*, 2008; Folmer *et al.*, 2014; Nile y Park, 2014). Los polifenoles son producidos en el metabolismo secundario de las plantas y juegan un papel importante en los procesos de maduración, mecanismos de defensa y caracterización sensorial de los productos alimenticios derivados de las plantas (Cimato *et al.*, 1990; Wollgast y Anklam, 2000, Pal y Verma, 2013).

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es particularmente rico en polifenoles que representan entre el 12 y 18% del peso seco de los granos, y se encuentran fuertemente asociados con la actividad antioxidante y con las características organolépticas de los

productos elaborados a partir de los granos (Bravo, 1998; Wollgast y Anklam, 2000; Jonfia-Essien *et al.*, 2008; Latif, 2013). Los polifenoles se encuentran en las células pigmentarias de los cotiledones, y le aportan colores que van del blanco hasta un morado oscuro, dependiendo específicamente de la cantidad de antocianinas almacenadas (Osman *et al.*, 2004; Krysiak, 2006). En los frutos de cacao, se pueden distinguir tres tipos de polifenoles: catequinas o flavan-3-oles (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%). La principal catequina es (-)-epicatequina con un máximo de hasta el 35% del contenido de polifenoles. También se han encontrado en cantidades menores (+)-catequina (+)-galocatequina y (-) epigallocatequina (Wollgast y Anklam, 2000; Ortega *et al.*, 2008).

En diversos estudios se ha reportado que el cacao y sus derivados presentan una gran variedad de propiedades beneficiosas para la salud en humanos.

1 Ingeniera Biológica. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Escuela de Química. A.A 3840, Medellín, Colombia. <szapatab@unal.edu.co>

2 Ingeniera Biológica. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Escuela de Química. A.A 3840, Medellín, Colombia. <atamayo@unal.edu.co>

3 Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Escuela de Química. A.A 3840, Medellín, Colombia. <brojano@unal.edu.co>

En algunos informes se señala que el consumo de cacao o chocolate reduce el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares. Los polifenoles del cacao generan una disminución en el colesterol total, regulan la presión arterial sistólica y diastólica, e inactivan los radicales superóxido, el hidroxilo y los radicales lipídicos; así mismo, inhiben la peroxidación lipídica (LDL) *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, se ha observado el mejoramiento en la capacidad vasodilatadora de las arterias braquiales, en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias, al suministrarles bebidas de cacao (Keen *et al.*, 2005; Heiss *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2010; Schinella *et al.*, 2010; Cherniack, 2011).

El tostado es una de las operaciones tecnológicas más importantes en el procesamiento del cacao. Durante el tratamiento térmico, se producen compuestos derivados de las reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos, conocidas comúnmente como las reacciones de Maillard o pardeamiento no enzimático (Yamaguchi *et al.*, 1981). Estas reacciones generan una variedad de productos, intermediarios y pigmentos marrones (melanoidinas); los cuales contribuyen a la actividad antioxidante, sabor y color del grano tostado (Yamaguchi *et al.*, 1981; Summa *et al.*, 2006; Oliviero *et al.*, 2009). Entre estos compuestos se encuentran alcoholes, éteres, tiazoles, pironas, ácidos, ésteres, aldehídos, iminas, aminas, oxazoles, pirazinas y pirroles (Misnawi *et al.*, 2004). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tostado sobre el contenido de metabolitos secundarios como fenoles totales, taninos condensados, antocianinas totales, catequina, epicatequina, teobromina y cafeína; y la actividad antioxidante por ABTS⁺⁺, ORAC y capacidad atrapadora de radicales superóxido; en cinco clones de cacao cultivados en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron cinco clones de cacao fermentados y secos (CCN 51, ICS 1, ICS 60, ICS 95 y TSH 565) procedentes de la granja Tierradura, ubicada en el municipio de Miranda en el departamento del Cauca, Colombia. Los frutos en estado de colecta con edades similares y sin presencia de patógenos en su corteza, fueron seleccionados de forma aleatoria en las diferentes partes del árbol. El tostado se realizó con 100 g de muestra de semilla con cáscara, las cuales fueron distribuidas uniformemente en una parrilla de acero inoxidable en un horno (Binder[®], ED 53-UL); a 180 °C durante 10 min (Oliviero *et al.*, 2009).

Reactivos y equipos. Los reactivos utilizados correspondieron a: ABTS [2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], NADH [Nicotinamida adenina dinucleótido], NBT [nitroazul de tetrazolio], PMS [Metosulfato de fenazina] Trolox (Sigma-Aldrich[®]). El AAPH [2,20-Azo-bis34 (2-amidinopropano) dihidrocloruro] usado como una fuente de radicales peroxilos, Acido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), fluoresceinato de sodio, ácido gálico, catequina, (-)-epicatequina, teobromina, cafeína, glucosa y fructosa (Sigma-Aldrich[®]). El metanol, fosfato ácido de sodio, fosfato básico de sodio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, vainillina, reactivo de Folin y carbonato de sodio (Merck[®]). Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway[®] 6405. Las lecturas de fluorescencia se hicieron en un espectrofluorímetro Perkin Elmer[®] modelo LS- 55. Los estudios cromatográficos por HPLC se efectuaron en un cromatógrafo Shimadzu[®] LC-20AD.

Extracción metanólica. Se homogenizaron 10 g de muestra macerada de granos de cacao en 100 mL de metanol. La mezcla se almacenó en un shaker (New Brunswick, Innova[®] 4400) a 150 rpm, 30 °C durante 48 h y finalmente, se filtró. El extracto obtenido se utilizó para la determinación de la capacidad antioxidante y el contenido de metabolitos secundarios.

Extracción de metabolitos secundarios para el análisis de HPLC. La preparación del extracto se realizó siguiendo la metodología descrita por Gu *et al.* (2006). Se extrajo 1 g de muestra macerada de granos de cacao en 10 mL de metanol en un tubo de polipropileno de 50 mL, durante 15 min en un sonicador (VWR Scientific[®], B1500A-DTH). El tubo fue centrifugado a 4.000 rpm durante 10 min en una centrifuga (Thermo Scientific[®], Heraeus Biofuge) y el sobrenadante fue decantado a un tubo limpio de 50 mL. La muestra se extrajo con otros 10 mL de metanol. Los extractos de metanol se combinaron y fueron filtrados a través de un filtro Sartorius[®] de 0,45 µm antes de la inyección en el equipo.

Determinación de fenoles totales. Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu. En un tubo de reacción se adicionaron 50 µL del extracto metanólico, 425 µL de agua destilada y 125 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck[®]). Se agitó y luego se dejó en reposo por 6 min. Posteriormente se adicionaron 400 µL de Na₂CO₃ al 7,1%. Después de 1 hora en la oscuridad se leyó la absorbancia a 760 nm (Singleton y Rossi, 1965). Se usaron soluciones de ácido gálico

entre 50 – 500 µg mL⁻¹ para construir la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico / g de cacao.

Determinación de taninos condensados. Se empleó una técnica para estimación espectrofotométrica de taninos condensados, según el protocolo de Hagerman *et al.* (1998). En un tubo de reacción se adicionaron 230 µL del extracto metanólico y 670 µL de una solución de vainillina 10.000 ppm (en ácido sulfúrico al 70%). Se agitó y se incubó en un baño de agua a 20 °C durante 15 min. Luego se evaluó la absorbancia a 500 nm. El contenido de taninos se expresó como mg de catequina / g de cacao.

Determinación del contenido total de antocianinas. Se usó el método diferencial de pH. Las lecturas se realizaron a 530 y a 700 nm para la eliminación de interferencias debidas a la turbidez de fondo, en buffers a pH 1,0 y 4,5, utilizando la ecuación (1) y un coeficiente de extinción molar de 26900. En un tubo de reacción se adicionaron 100 µL del extracto y 900 µL del buffer. Se agitó y luego se dejó en reposo por 30 min (Gaviria *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos se expresaron como mg de cianidina-3-glucósido / g de cacao.

$$A = (A_{530} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{530} - A_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia.

Determinación de (+)-catequina y (-)-epicatequina. Se realizó mediante un análisis cromatográfico por HPLC según el protocolo de Oliviero *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo (Shimadzu®, LC-20AD), equipado con un auto inyector SIL-20A /HT, un módulo de comunicación CBM-20A y un detector con arreglo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, calibrado a 280 nm. La separación de (+)-catequina y (-)-epicatequina se llevó a cabo en una columna C-18 ultra acuosa cuyas dimensiones eran 5 µm de tamaño de partícula, 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro. Como fase móvil se utilizó metanol (A) acidulado con ácido fórmico al 0,1% (B), con gradientes de elución de 0,01 min 60% de A; 5-12 min 80% de A; 13-14 min 60% de A. La razón de flujo de la fase móvil fue 1,0 mL/min. La identificación de los picos se realizó comparando con estándares de (+)-catequina y (-)-epicatequina (Sigma-Aldrich®).

Determinación de teobromina y cafeína. Se hizo por HPLC según el protocolo de Brunetto *et al.* (2007), con

algunas modificaciones. Se empleó un cromatógrafo (Shimadzu®, LC-20AD), equipado con un auto inyector SIL-20A /HT, un módulo de comunicación CBM-20A y un detector con arreglo de fotodiodos (PDA) SPD-M20A, calibrado a 280 nm. La separación de teobromina y cafeína se llevó a cabo en una columna C-18 ultra acuosa. Como fase móvil se utilizó metanol al 100% en modo isocrático a un flujo de 1,0 mL/min. La identificación de los picos se realizó comparando con estándares de teobromina y cafeína (Sigma-Aldrich®).

Actividad atrapadora del radical ABTS•+. La actividad antioxidante se estableció siguiendo la metodología de Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones (Álvarez *et al.*, 2011). El radical catiónico ABTS•+ se generó por la reacción de oxidación del ABTS (3,5 mM) con persulfato de potasio (1,25 mM). Después de 24 h de reacción, se ajustó la absorbancia con buffer fosfato pH 7,4 hasta 0,70 unidades, a una longitud de onda de 732 nm. Para la evaluación se hicieron reaccionar 990 µL del reactivo ABTS con 10 µL del extracto de cacao. Como referencia se usó la misma cantidad de ABTS y 10 µL del solvente de la muestra (metanol). Las mezclas se dejaron en reposo y en ausencia de luz durante 30 min. Posteriormente se midieron sus absorbancias a 732 nm. Los resultados se expresaron como valores TEAC (µmol de trolox / g de cacao).

Método ORAC. El ensayo ORAC se determinó por la metodología descrita por Ou *et al.* (2001), con algunas modificaciones (Mesa *et al.*, 2010; Naranjo *et al.*, 2011). Se prepararon 3 mL de la siguiente solución: 21 µL de una solución de fluoresceína 10 µM, 2899 µL de buffer fosfato 75 mM (pH 7,4), 50 µL de AAPH 600 mM y 30 µL de extracto de cacao o Trolox 500 µM (estándar). La fluorescencia se registró cada 60 s a 37 °C, usando un espectrofluorímetro Perkin Elmer® LS45 con una multicelda termostatazada. Las lecturas se realizaron a una λ de excitación de 493 nm y una λ de emisión de 515 nm. El valor ORAC se calculó con la ecuación 2 y los resultados fueron expresados como valores TEAC (µmol de trolox / g de cacao).

$$\text{ORAC} = \left(\frac{\text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{control}}}{\text{AUC}_{\text{trolox}} - \text{AUC}_{\text{control}}} \right) f[\text{trolox}] \quad (2)$$

AUC es el área bajo la curva y *f* es el factor de dilución de los extractos.

Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales superóxido. El ensayo evalúa la capacidad de los

antioxidantes para atrapar los radicales superóxido, los cuales son generados por el sistema NADH/PMS. La actividad se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Barreca *et al.* (2010), con algunas modificaciones. La reacción se llevó a cabo en buffer fosfato 75 mM, pH 7,4. Las soluciones se adicionaron en las siguientes cantidades: 60 μL de NBT 156 μM , 60 μL de NADH 468 μM , 15 μL de extracto de cacao y finalmente 165 μL de PMS 10 μM . Luego de 5 min de reacción, se registró la absorbancia a 560 nm. Los resultados obtenidos son reportados como mg de catequina / g de cacao.

Análisis estadístico. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron los valores como los promedios \pm la desviación estándar (DE). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de mínima diferencia significativa (LSD), con un $P < 0,05$ para comparación de medias en cada una de las variables analizadas (contenido de metabolitos secundarios y actividad antioxidante) en los diferentes tratamientos (tostar y sin tostar); usando el paquete estadístico SAS 9.2. Las regresiones lineales fueron calculadas con un

nivel de significancia del 95% ($P < 0,05$), mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra el contenido de metabolitos fenólicos en los granos de cacao crudos sometidos al proceso de tostado. Los valores variaron en un intervalo de 21,69 - 38,64 mg g^{-1} en granos sin tratar, y 20,60 - 42,79 mg g^{-1} en granos tostados. El contenido de compuestos fenólicos de granos de cacao y productos derivados ha sido definido entre un rango de 45 - 52 mg g^{-1} en licor de cacao, 34 - 60 mg g^{-1} en granos de cacao y 20 - 62 mg g^{-1} en polvo de cacao (Nazaruddin *et al.*, 2006). La diferencia entre los valores reportados y los obtenidos puede atribuirse a las variedades de granos evaluados. Cabe resaltar que existen factores internos y externos que afectan la calidad y/o cantidad de los compuestos fenólicos en las plantas, como la diversidad genética (variedad y origen de la muestra), etapa de madurez, variables ambientales (intensidad de la luz, clima, temperatura, uso de fertilizantes, heridas), método de extracción, procesamiento y almacenamiento (Vallejo *et al.*, 2003; Niemenak *et al.*, 2006; Schinella *et al.*, 2010).

Tabla 1. Contenido de metabolitos fenólicos de cinco genotipos de cacao sometidos al proceso de tostado.

Clon		Fenoles Totales	Taninos condensados	Antocianinas totales	Catequina	Epicatequina
				(mg g^{-1})		
CCN 51	Sin tratar	21,69 \pm 0,51 ab	32,61 \pm 0,65 a	0,99 \pm 0,01 a	1,25 \pm 0,02	3,31 \pm 0,17 a
	Tostado	20,60 \pm 0,32 b	22,78 \pm 0,86	0,82 \pm 0,01	3,35 \pm 0,05	3,12 \pm 0,01 a
ICS 1	Sin tratar	35,36 \pm 0,18	66,10 \pm 0,66	1,26 \pm 0,05	0,22 \pm 0,03 a	10,20 \pm 0,47
	Tostado	25,83 \pm 0,99	35,76 \pm 0,50	0,18 \pm 0,01 b	1,35 \pm 0,02	1,04 \pm 0,09
ICS 60	Sin tratar	37,31 \pm 1,79 c	46,92 \pm 1,08	1,01 \pm 0,02 a	0,22 \pm 0,02 a	8,26 \pm 0,02
	Tostado	42,79 \pm 0,66 d	56,40 \pm 0,89	0,99 \pm 0,01 a	0,02 \pm 0,00 b	2,14 \pm 0,02
ICS 95	Sin tratar	22,80 \pm 0,20 ab	32,09 \pm 1,02 a	0,59 \pm 0,02	2,25 \pm 0,10	7,26 \pm 0,08
	Tostado	21,74 \pm 0,18 b	20,79 \pm 0,61	0,17 \pm 0,00 b	0,25 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00
TSH 565	Sin tratar	38,64 \pm 1,92 c	77,24 \pm 1,19	1,60 \pm 0,02	0,53 \pm 0,08	3,14 \pm 0,05 a
	Tostado	41,77 \pm 0,83 d	58,31 \pm 1,16	0,40 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00 b	0,04 \pm 0,00

Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar ($n=3$). Las medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes a un nivel de $P < 0,05$.

En los granos de cacao sin tratar sometidos al proceso de tostado, se observó un incremento en el contenido de fenoles totales en los clones ICS 60 y TSH 565; efecto que se atribuye a los tratamientos térmicos que producen compuestos derivados de las reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos, conocidas comúnmente como las reacciones de Maillard o

pardeamiento no enzimático. Varios estudios han demostrado que estas reacciones generan una variedad de productos, intermediarios y pigmentos marrones (melanoidinas); los cuales contribuyen a la actividad antioxidante, sabor y color de los alimentos, además son agentes reductores que pueden ser detectados por el método de Folin - Ciocalteu

(Yamaguchi *et al.*, 1981; Summa *et al.*, 2006; Oliviero *et al.*, 2009).

El contenido de taninos condensados estuvo en un rango entre 32,09 - 77,24 mg g⁻¹ para granos sin tratar, y de 20,79 a 58,31 mg g⁻¹ en granos tostados. Gu *et al.* (2006) reportaron que el contenido total de procianidinas en cacao en polvo natural, varía entre un rango de 32,19 y 48,79 mg g⁻¹. Miller *et al.* (2006) registraron valores entre 19,28 y 23,71 mg g⁻¹; y en un estudio posterior obtuvieron valores entre 22,86 a 40,25 mg g⁻¹ en el mismo producto (Miller *et al.*, 2008).

Después del tostado, el clon ICS 60 presentó un aumento en el contenido de procianidinas; mientras que los demás clones mostraron una disminución después del procesamiento. Este comportamiento irregular ha sido mencionado en diferentes estudios para diversas frutas. En melocotón por ejemplo, el procesamiento térmico causó una reducción del 5 al 11% de compuestos monoméricos a partir de procianidinas pentámicas, y alrededor del 30% para hexámeros y heptámeros (Hong *et al.*, 2004). Sin embargo, un estudio con el jugo de uva sugirió un aumento en la mayoría de las procianidinas después de la pasteurización (Fuleki y Ricardo Da Silva, 2003). Así mismo, se ha observado que la pulpa de arándanos azules sometida a un proceso de extrusión, el cual utiliza temperaturas y presiones altas, mejora el contenido de procianidinas de bajo peso molecular y reduce las procianidinas de alto peso molecular incluyendo polímeros (Khanal *et al.*, 2007); la disminución de procianidinas de alto peso molecular puede deberse a que estos compuestos interactúan irreversiblemente con polisacáridos a través de puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

En el contenido de antocianinas se observó una disminución después del proceso de tostado, esto puede deberse a su inestabilidad a altas temperaturas. El contenido de azúcares como fructosa y glucosa tienen un efecto negativo sobre el contenido de antocianinas. La velocidad de degradación es asociada a la velocidad a la cual el azúcar es convertido a compuestos tipo furfural, como el 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Markakis *et al.*, 1957); estos compuestos son producidos por las reacciones de Maillard durante el tostado de los granos. Además, las altas temperaturas utilizadas en el proceso de tostado afectan el contenido de antocianinas, causando una pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la

molécula y una apertura del anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Timberlake, 1980). Yue y Xu, (2008) demostraron que el 30% de las antocianinas de un extracto de arándano fueron convertidas térmicamente a antocianidinas, al calentar un extracto a 100 °C durante 30 min; sugiriendo que las antocianinas podrían descomponerse a moléculas pequeñas o perder su azúcar conjugado para convertirse en su antocianidina correspondiente durante el tratamiento térmico.

Contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina. En los granos de cacao sometidos al proceso de tostado la catequina mostró valores entre 0,22 y 2,25 mg g⁻¹ en granos sin tratar, y 0,02 y 3,35 mg g⁻¹ en granos tostados. En cuanto al contenido de epicatequina, se observa que fue mayor que el contenido de catequina con valores que variaron en un intervalo de 3,14 y 10,20 mg g⁻¹ en granos sin tratar, y 0,01 y 3,12 mg g⁻¹ en granos tostados (Tabla 1). El contenido de catequina y epicatequina para otros materiales genéticos ha sido reportado en un rango entre 2,25 y 3,91 mg g⁻¹ en granos sin tratar (Nazaruddin *et al.*, 2006) y 2,70 – 12,35 mg g⁻¹ en granos de cacao secos (Othman *et al.*, 2010); respectivamente.

Se evidencia un incremento en el contenido de catequina en los clones sin tratar CCN 51 e ICS 1, en las demás variedades hubo una reducción de este componente; mientras el contenido de epicatequina disminuyó en todos los clones evaluados durante este tratamiento. Este comportamiento fue apreciado por Payne *et al.* (2010), quienes afirman que durante el tostado a 120 °C hubo pérdidas de epicatequina, mientras el contenido de catequina aumentó en un 696% en el grano sin fermentar, 650% en el grano proveniente de Costa de Marfil y 640% en los granos fermentados de Papua Nueva Guinea; sugiriendo que el tostado por encima de 70 °C genera cantidades significativas de (-)-catequina, probablemente debido a la epimerización de (-)-epicatequina.

Contenido de teobromina y cafeína. En la Tabla 2 se presenta el contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína) en los granos de cacao sometidos al proceso de tostado. El contenido de teobromina varía en un intervalo de 2,75 y 4,38 mg g⁻¹ en granos sin tratar, y 0,81 y 3,11 mg g⁻¹ en granos tostados. Por otro lado, el contenido de cafeína fue menor con respecto al contenido de teobromina para los clones de cacao evaluados. Los valores varían de 0,43 y 3,54 mg g⁻¹ en granos sin tratar, y 0,16 y 1,21 mg g⁻¹ en granos tostados.

Tabla 2. Contenido de metilxantinas de cinco genotipos de cacao sometidos al proceso de tostado.

Clon		Teobromina		Cafeína	
		(mg g ⁻¹)			
CCN 51	Sin tratar	3,99 ± 0,076		0,96 ± 0,000	
	Tostado	3,11 ± 0,054		1,21 ± 0,039	
ICS 1	Sin tratar	2,75 ± 0,050		0,50 ± 0,001 a	
	Tostado	1,63 ± 0,014		0,52 ± 0,002 a	
ICS 60	Sin tratar	4,38 ± 0,000		3,54 ± 0,000	
	Tostado	2,35 ± 0,014		0,80 ± 0,017	
ICS 95	Sin tratar	3,86 ± 0,067		0,43 ± 0,038	
	Tostado	1,22 ± 0,018		0,19 ± 0,000 b	
TSH 565	Sin tratar	3,11 ± 0,068		0,91 ± 0,046	
	Tostado	0,81 ± 0,006		0,16 ± 0,002 b	

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Las medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes según LSD (P≤0,05).

Se observa que el contenido de metilxantinas en los granos de cacao disminuyó después del proceso de tostado. Durante el tostado del cacao, hay un incremento en el contenido de algunas sustancias relacionadas con dicetopiperazinas (DKPs o dipéptidos cíclicos), influenciando negativamente en la calidad sensorial del cacao. Estos compuestos interactúan con los alcaloides de purinas, disminuyendo el contenido de teobromina y cafeína. Durante el tostado, puede originarse un sabor metálico amargoso de las DKPs y pronunciarse cuando estas DKPs se combinan con alcaloides de la purina (Bonvehi y Ventura, 2000).

Contenido de azúcares reductores. Los azúcares reductores son compuestos que definen algunas características sensoriales de los productos alimenticios

comercializados a partir de granos de cacao. La composición de los azúcares reductores en el grano de cacao, está determinada por algunos factores como: genotipo, condiciones agroclimáticas del cultivo, tipo de fermentación, secado y proceso de industrialización (De Brito *et al.*, 2000). El contenido de glucosa de los clones estudiados varió en un intervalo de 0,70 y 0,95 mg g⁻¹ en granos sin tratar, y 0,70 y 0,80 mg g⁻¹ en granos tostados. El contenido de fructosa arrojó valores entre 0,54 y 0,66 mg g⁻¹ en granos sin tratar, y 0,52 y 0,66 mg g⁻¹ en granos tostados (Tabla 3). El contenido de fructosa y glucosa en los granos tostados no mostraron cambios estadísticamente significativos, comparados con los granos sin tratar. Estos resultados difieren con los datos de Redgwell *et al.* (2003), quienes

Tabla 3. Contenido de azúcares reductores de cinco genotipos de cacao sometidos al proceso de tostado.

Clon		Glucosa		Fructosa	
		(mg g ⁻¹)			
CCN 51	Sin tratar	0,75 ± 0,021 a		0,58 ± 0,011 a	
	Tostado	0,75 ± 0,068 ab		0,54 ± 0,005 ab	
ICS 1	Sin tratar	0,70 ± 0,007 a		0,54 ± 0,009 ab	
	Tostado	0,70 ± 0,003 a		0,53 ± 0,002 b	
ICS 60	Sin tratar	0,95 ± 0,069 c		0,57 ± 0,009 ab	
	Tostado	0,80 ± 0,024 b		0,66 ± 0,074 c	
ICS 95	Sin tratar	0,73 ± 0,021 a		0,66 ± 0,004 d	
	Tostado	0,70 ± 0,003 a		0,52 ± 0,001 b	
TSH 565	Sin tratar	0,75 ± 0,039 a		0,55 ± 0,027 ab	
	Tostado	0,72 ± 0,007 a		0,53 ± 0,001 b	

Los valores son expresados como la media ± desviación estándar (n=3). Las medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes según LSD (P≤0,05).

encontraron una disminución en los niveles de glucosa y fructosa después del tostado. Un factor que puede interferir en el contenido de azúcares disponibles es la alta concentración de polifenoles durante el proceso de tostado, que reduce las degradaciones de aminoácidos libres y azúcares reductores; y por ende, la formación de productos de las reacciones de Maillard como pirazinas (Misnawi *et al.*, 2004).

Actividad antioxidante. La actividad atrapadora del radical ABTS+ arrojó valores de 384,36 y 686,29 $\mu\text{mol Tx g}^{-1}$ en los granos sin tratar, y 225,40 y 802,58 μmol

Tx g^{-1} en los granos tostados, donde el mayor cambio se presentó para los clones ICS 60 y TSH 565. Los valores ORAC variaron entre 1.473,22 y 2.873,58 $\mu\text{mol Tx g}^{-1}$ en los granos sin tratar, y 577,35 y 2.467,09 $\mu\text{mol Tx g}^{-1}$ en los granos tostados; mostrando un aumento para el clon TSH 565 después del procesamiento del grano. La capacidad atrapadora de radicales superóxido arrojó valores entre 8,22 y 31,54 mg g^{-1} en los granos sin tratar, y 5,47 y 29,38 mg g^{-1} en los granos tostados. El proceso de tostado incrementó esta propiedad en las variedades ICS 60 y TSH 565 (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antioxidante de cinco genotipos de cacao sometidos al proceso de tostado.

Clon		ABTS+	ORAC	O_2^-
		$(\mu\text{mol g}^{-1})$		(mg g^{-1})
CCN 51	Sin tratar	384,36 \pm 23,38 a	1473,22 \pm 65,15 a	8,22 \pm 0,93
	Tostado	362,60 \pm 7,86 a	577,35 \pm 45,39 b	5,47 \pm 0,53
ICS 1	Sin tratar	633,45 \pm 20,54 b	2036,23 \pm 1,22	16,05 \pm 1,79 a
	Tostado	431,33 \pm 21,97	714,13 \pm 19,22 b	17,00 \pm 0,82 ab
ICS 60	Sin tratar	686,29 \pm 24,95 c	2873,58 \pm 141,40	19,00 \pm 1,73
	Tostado	802,58 \pm 20,72	2356,84 \pm 214,32 c	27,19 \pm 1,42
ICS 95	Sin tratar	415,35 \pm 3,58	1604,29 \pm 32,22 a	31,54 \pm 0,95
	Tostado	225,40 \pm 3,91	1187,37 \pm 59,95	18,22 \pm 1,13 b
TSH 565	Sin tratar	661,00 \pm 17,33 bc	2311,52 \pm 1,26 c	27,49 \pm 1,51
	Tostado	701,41 \pm 3,60	2467,09 \pm 16,55 c	29,38 \pm 0,46

Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (n=3). Las medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes según LSD ($P \leq 0,05$).

El efecto del proceso de tostado sobre los clones de cacao no tuvo un comportamiento definido, se observaron cambios positivos como negativos en la actividad antioxidante de los granos de cacao dependiendo de la variedad (Figura 1). Suazo *et al.* (2014) apreciaron efectos similares en granos de cacao Nicaragüense al comparar diferentes temperaturas de tostado, mostraron que el efecto sobre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante no era uniforme; reportando un efecto positivo sobre la actividad antioxidante en granos tostados a 150 °C.

El aumento de la actividad antioxidante por las diferentes metodologías, coincide con el contenido de fenoles totales, mostrando una posible correlación entre estos metabolitos y la actividad antioxidante de los granos de cacao. En numerosos estudios han concluido que el contenido fenólico puede contribuir significativamente a su capacidad antioxidante. Gu

et al. (2006) obtuvieron una alta correlación entre el contenido de procianidinas, una clase de polifenoles, y la actividad antioxidante por ORAC. Othman *et al.* (2007) obtuvieron correlaciones positivas entre la actividad antioxidante evaluada por FRAP y el contenido fenólico. Schinella *et al.* (2010) demostraron que la capacidad atrapadora de radicales DPPH·, ABTS+, FRAP, superóxido, ácido hipocloroso y peroxinitrito, aumentaba en proporción directa con el contenido de compuestos fenólicos de extractos de cacao con diferentes concentraciones de polifenoles.

Además, la capacidad antioxidante puede incrementarse por el desarrollo de nuevos compuestos con potencial antioxidante. Estos compuestos son producto de las reacciones de Maillard, en particular, melanoidinas; que son responsables de la actividad atrapadora de radicales libres (Yamaguchi *et al.*, 1981; De Brito *et al.*, 2000; Oliviero *et al.*, 2009; Suazo *et al.*, 2014).

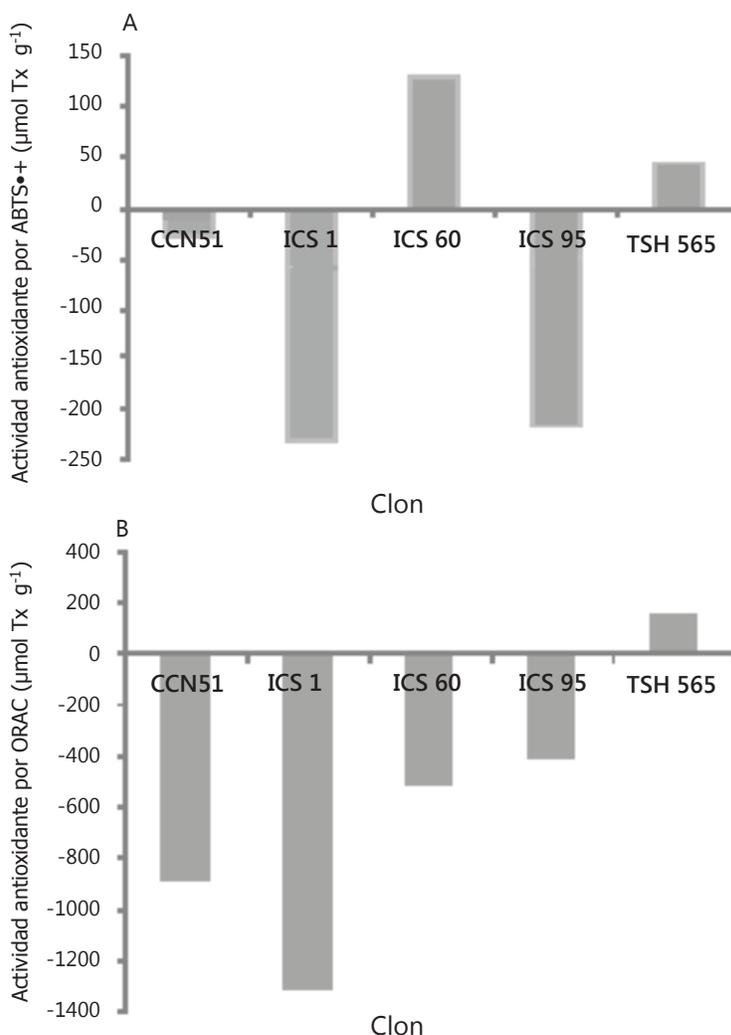


Figura 1. Efecto del proceso de tostado sobre la actividad antioxidante de los granos de cacao. A) Método ABTS•+, B) Método ORAC.

CONCLUSIÓN

El contenido de metabolitos secundarios y por ende, el potencial antioxidante de los granos de cacao dependieron del clon utilizado y del proceso de tostado al que fueron sometidos. No es posible establecer un efecto general del tostado sobre el contenido de metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de los granos de cacao, ya que los clones mostraron comportamientos diferentes. Sin embargo, el contenido de compuestos fenólicos y los productos de las reacciones de Maillard pueden contribuir significativamente sobre la capacidad antioxidante y finalmente sobre las características organolépticas finales de los granos de cacao tostados.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por el apoyo a la Joven Investigadora Sandra Zapata Bustamante. A la Dirección de Investigaciones (DIME) de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por el apoyo financiero a través del proyecto 20101007959. Igualmente, se agradece a la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), por el suministro de las muestras; especialmente al Ing. Juan Carlos Agudelo.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, C., B. Rojano, O. Almaza, O.J. Rojas and P. Gañan. 2011. Self-bonding boards from plantain

- fiber bundles after enzymatic treatment: adhesion improvement of lignocellulosic products by enzymatic pre-treatment. *Journal of Polymers and the Environment* 19(1): 182–188.
- Amin, I., M.M. Zamaliah and W.F. Chin. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* 87(4): 581-586.
- Barreca, D., E. Bellocco, C. Caristi, U. Leuzzi and G. Gattuso. 2010. Flavonoid composition and antioxidant activity of juices from chinotto (*Citrus myrtifolia* raf.) fruits at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(5): 3031–3036.
- Bonvehi, J.S. and F. Ventura. 2000. Evaluation of purine alkaloids and diketopiperazines contents in processed cocoa powder. *European Food Research and Technology* 210(3): 189–195.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56(11): 317-333.
- Brunetto, M.R., L. Gutiérrez, Y. Delgado, M. Galignani, A. Zambrano, A. Gómez, G. Ramírez and C. Romero. 2007. 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 Chemistry* 100(2): 459–467.
- Cherniack, E.P. 2011. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition* 27(6): 617-623.
- Cimato, A., A. Mattei and M. Osti. 1990. Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Horticulturae* 286: 453–456.
- De Brito, E.S., N.H. Pezoa García, M.I. Gallão, A.L. Cortelazzo, P.S. Fevereiro and M.R. Braga. 2000. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 81(2): 281–288.
- Folmer, F., Y. Basavaraju, M. Jaspars, G. Hold, E. El-Omar, M. Dicato and M. Diederich. 2014. Anticancer effects of bioactive berry compounds. *Phytochemistry Review* 13: 295–322.
- Fuleki, T. and J.M. Ricardo-Da-Silva. 2003. Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3): 640–646.
- Gaviria, C., C. Ochoa, N. Sánchez, C. Medina, M. Lobo, P. Galeano, A. Mosquera, A. Tamayo, Y. Lopera y B. Rojano. 2009. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(6): 519-528.
- Gu, L., S.E. House, X. Wu, B. Ou and R.L. Prior. 2006. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(11): 4057–4061.
- Hagerman, A.E., K.M. Riedl, G.A. Jones, K.N. Sovi, N.T. Ritchard, P.W. Hartzfeld and T.L. Riechel. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(5): 1887-1892.
- Heiss C., S. Jahn, M. Taylor, W. Real, F. Angeli, M. Wong, N. Amabile, M. Prasad, T. Rassaf, J. Ottaviani, S. Mihardja, C. Keen, M. Springer, A. Boyle, W. Grossman, S. Glantz, H. Schroeter and Y. Yeqhiazarians. 2010. Improvement of endothelial function with dietary flavanols in associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 56(3): 218–224.
- Hong, Y.J., D.M. Barrett and A.E. Mitchell. 2004. Liquid chromatography/mass spectrometry investigation of the impact of thermal processing and storage on peach procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(8): 2366–2371.
- Jia, L., X. Liu, Y.Y. Bai, S.H. Li, K. Sun, C. He and R. Hiu. 2010. Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition* 92(1): 218–225.
- Jonfia-Essien, W.A., G. West, P.G. Alderson and G. Tucker. 2008. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry* 108(3): 1155–1159.
- Keen, C.L., R.R. Holt, P.I. Oteiza, C.G. Fraga and H.H. Schmitz. 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular

- health. *American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 298S–303S.
- Khanal, R., L.R. Howard, C. Brownmiller and R.L. Prior. 2007. Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science* 74(2): 52–58.
- Krysiak, W. 2006. Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *Journal of Food Engineering* 77(3): 449–453.
- Latif, R. 2013. Health benefits of cocoa. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 16(6): 669–674.
- Le Bourvellec, C., S. Guyot and C.M. Renard. 2004. Non-colalent interaction between procyanidins and apple cell wallmaterial. Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1672(3): 192–202.
- Markakis, P., G.E. Livingston and R.C. Fellers. 1957. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation. *Food Research* 22(2): 117–130.
- Mesa, A.M., C.A. Gaviria, F. Cardona, J.A. Sáez- Vega, S. Blair y B. Rojano. 2010. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 15(2): 13–26.
- Miller, K.B., D.A. Stuart, N.L. Smith, C.Y. Lee, N.L. McHale, J.A. Flanagan, B. Ou and W.J. Hurst. 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(11): 4062–4068.
- Miller, K.B., W.J. Hurst, M.J. Payne, D.A. Stuart, J. Apgar, D.S. Sweigart and B. Ou. 2008. Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(18): 8527–8533.
- Misnawi, S., S. Jinap, B. Jamilah and S. Nazamid. 2004. Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry* 85(1): 73–80.
- Naranjo, M., T. Vélez y B. Rojano. 2011. Actividad antioxidante de café colombiano de diferentes calidades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16(2): 164–173.
- Nazaruddin, R., L.K. Seng, O. Hassan and M. Said. 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products* 24(1): 87–94.
- Niemenak, N., C. Rohsius, S. Elwers, D.O. Ndoumou and R. Lieberei. 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(6-7): 612–619.
- Nile, S.H. and S.W. Park. 2014. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 30(2): 134–144.
- Oliviero, T., E. Capuano, B. Cammerer and V. Fogliano. 2009. Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(1): 147–152.
- Ortega, N., M.P. Romero, A. Macia, J. Reguant, N. Angles, J.R. Morello and M.J. Motilva. 2008. Obtention and characterisation of phenolic extracts from different cocoa sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(20): 9621–9627.
- Osman, H., R. Nasarudin and S.I. Lee. 2004. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chemistry* 86(1): 41–46.
- Othman, A., A. Ismail, N.A. Ghani and I. Adenan. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* 100(4): 1523–1530.
- Othman, A., A.M. Jalil, K.K. Weng, A. Ismail, N.A. Ghani and I. Adenan. 2010. Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *African Journal of Biotechnology* 9(7): 1052–1059.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill and R. Prior. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4619–4626.
- Pal, D. and P. Verma. 2013. Flavonoids: a powerful and abundant source of antioxidants. *International*

- Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5(3): 95-98.
- Payne, M.J., W.J. Hurst, K.B. Miller, C. Rank and D.A. Stuart. 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): 10518-27.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26(9-10): 1231-1237.
- Redgwell, R.J., V. Trovato and D. Curti. 2003. Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. Food Chemistry 80(4): 511-516.
- Schinella, G., S. Mosca, E. Cienfuegos-Jovellanos, M.A. Pasamar, B. Muguerza, D. Ramon and J.L. Ríos. 2010. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. Food Research International 43(6): 1614-1623.
- Singleton, V.I. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16(3): 144-158.
- Suazo, Y., G. Davidov-Pardo and I. Arozarena. 2014. Effect of fermentation and roasting on the phenolic concentration and antioxidant activity of cocoa from Nicaragua. Journal of Food Quality 37(1): 50-56.
- Summa, C., F. Cordeiro Raposo, J. McCourt, R. Lo Scalzo, K.H. Wagner, I. Elmadfa and E. Anklam. 2006. Effect of roasting on the radical scavenging activity of cocoa beans. Journal European Food Research and Technology 222(3-4): 368-375.
- Timberlake, C.F. 1980. Anthocyanins-occurrence, extraction and chemistry. Food Chemistry 5(1): 69-80.
- Vallejo, F., F.A. Tomás and C. García. 2003. Effect of climatic and sulphur fertilisation conditions, on phenolic compounds and vitamin C, in the inflorescences of eight broccoli cultivars. European Food Research and Technology 216(5): 395-401.
- Wollgast, J. and E. Anklam. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International 33(6): 423-447.
- Yamaguchi, N., Y. Koyama and M. Fujimaki. 1981. Fractionation and antioxidative activity of browning reaction products between D-xylose and glycine. Progress in Food and Nutrition Science 5(1-6): 429-439.
- Yue, X. and Z. Xu. 2008. Changes of anthocyanins, anthocyanidins, antioxidant activity in bilberry extract during dry heating. Journal of Food Science 73(6): 494-499.

