



Desarrollo de chocolate oscuro con nibs de cacao fermentado y no fermentado: polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante y evaluación sensorial

Development of dark chocolate with fermented and non-fermented cacao nibs: total polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity and sensory evaluation

Jesica D. Delgado¹; Jenny I. Mandujano²; Darlym Reátegui¹; Elizabeth S. Ordoñez^{1,*}

¹ Universidad Nacional Agraria de la Selva, Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias, Carretera Central km. 1.2 Tingo María – Perú.

² Macao SAC, Pucacaca, Tarapoto, Perú.

Received June 4, 2018. Accepted November 23, 2018.

Resumen

Los objetivos fueron: determinar los polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante (DPPH y ABTS^{•+}) y evaluar sensorialmente el chocolate oscuro con nibs de cacao fermentado y no fermentado. Los chocolates elaborados incluyen 7% de nibs fermentado y no fermentado de las variedades CCN-51, blanco de Piura (CBP) y criollo o común (CCC). Se preparó un extracto hidroalcohólico (50:50 v/v), la muestra se desgrasó previamente. Los chocolates con nibs de cacao CCN-51, CBP y CCC no fermentado presentaron el mayor contenido de polifenoles totales y el menor correspondió a los chocolates sin nibs y con nibs fermentados; en cambio, los chocolates con nibs de cacao CCN-51 y CCC no fermentado presentaron el mayor contenido de antocianinas. La mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS^{•+} presentaron los chocolates con nibs CCN-51, CCC y CBP no fermentado. En la evaluación sensorial se encontraron tres grupos: en el primero (nibs CCN-51 y CCC fermentado y CCN-51 no fermentado) predominaron todos los atributos, en el segundo (nibs CCC y CBP no fermentado) resaltó el amargor, y para el tercero (nibs CBP fermentado) predominó la astringencia y el aroma floral.

Palabras clave: chocolate amargo; polifenoles; antocianinas; antioxidantes; análisis multivariado.

Abstract

The objectives were to determine the total polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity (DPPH and ABTS^{•+}) and to do a sensory evaluation of dark chocolate with fermented and unfermented cacao nibs. The chocolates include 7% unfermented and fermented nibs from the CCN-51, Piura Blanco (CBP – acronym in Spanish) and Criollo or Common (CCC – acronym in Spanish) varieties. A hydro alcoholic extract (50:50 v/v) was prepared, previously the sample was defatted. The chocolates with unfermented cacao nibs from CCN-51, CBP and CCC presented the greatest content of total polyphenols and the least corresponded to the chocolates without nibs and with fermented nibs; however, the chocolates with unfermented cacao nibs from CCN-51 and CCC had the greatest content of anthocyanins. Further, those which obtained the greatest antioxidant capacity against DPPH and ABTS^{•+} radicals were the chocolates with unfermented nibs from CCN-51, CCC and CBP. In the sensory evaluation, three groups were found: in the first (fermented nibs from CCN-51 and CCC and unfermented from CCN-51) predominated in all of the attributes, in the second group (unfermented nibs from CCC and CBP) the bitterness stood out, and for the third (nibs from fermented CBP) the astringency and floral aroma predominated.

Keywords: dark chocolate; polyphenols; anthocyanins; antioxidants; multivariate analysis.

1. Introducción

El chocolate es un alimento favorito entre los consumidores de todo el mundo (Brcanović *et al.*, 2013), este es consumido

como una golosina de confitería muchas veces evitado por el alto valor calorífico (alto contenido de azúcar y grasa); pero, en los últimos 20 años las investigaciones han

* Corresponding author

E-mail: darlym.reategui@unas.edu.pe (E. Ordoñez).

demostrado que el chocolate oscuro y el cacao podrían tener un efecto beneficioso en la salud humana debido al alto contenido de polifenoles, por tal motivo lograr ser reconocido como un alimento funcional (Ackar *et al.*, 2013; Belščak-Cvitanović *et al.*, 2015; Godočiková *et al.*, 2017). Además, el consumo mundial de chocolate y productos que contienen cacao está en aumento (10% entre 2002 y 2010), lo que podría atribuirse a la mejora económica del consumidor y al aumento del conocimiento de los posibles beneficios para la salud (Godočiková *et al.*, 2016).

Los polifenoles son un grupo grande y heterogéneo de metabolitos secundarios biológicamente activos en las plantas, donde actúan como materiales de soporte de la pared celular; precisamente del grupo de polifenoles los flavonoides son los más comunes en productos de cacao y pueden subdividirse en 4 grupos: isoflavonas, neoflavonoides y chalconas; flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanonoles; flavanoles (catequinas y epicatequinas) y proanthocyanidinas; antocianidinas (Tsao, 2010; Todorovic *et al.*, 2015; Ackar *et al.*, 2013). El cacao (*Theobroma cacao* L.) y productos como el chocolate parecen ser uno de los alimentos más prometedores debido a su alto contenido de polifenoles como los flavonoides, evidenciando las propiedades benéficas para la salud (Godočiková *et al.*, 2016). Asimismo, los polifenoles en los granos de cacao se encuentran en los cotiledones, su composición polifenólica depende de muchos factores como: tipo de cacao, origen geográfico, condiciones de crecimiento y madurez de la fruta de cacao, así como la fermentación y el procesamiento de alimentos (Ibrić y Čavar, 2014).

Los polifenoles han demostrado tener un papel importante en la salud humana, por ejemplo, el consumo de alimentos que son ricos en polifenoles se lo ha relacionado con la disminución del riesgo de muchas enfermedades crónicas como el cáncer, cardiovasculares, inflamaciones crónicas y muchas enfermedades degenerativas (Tsao, 2010). Los polifenoles pueden actuar como donantes de protones a radicales libres, inhibidores de enzimas que aumentan el estrés oxidativo, estas propiedades les permiten actuar como anticancerígeno, antiinflamatorio, antihepatotóxico, antibacteriano, antiviral y compuestos antialérgicos (Ackar *et al.*, 2013). Los flavonoides presentes en el cacao poseen buena capacidad antioxidante comparado a otros alimentos como el té y vino rojo (Martín *et al.*, 2016); además, los flavo-

noides y flavanoles como el flavan-3-ols actúan previniendo las enfermedades cardiovasculares, alivio de hipertensión, regulación del azúcar en la sangre y la insulina dependencia, riesgo reducido de diabetes tipo II (Lakshmana *et al.*, 2014). Los efectos en la salud dependen de su biodisponibilidad, que es también afectado por su estructura química, la absorción de epicatequina y catequina en el intestino está en promedio entre 22% y 55%, mientras que los dímeros y trímeros son poco absorbidos (menos del 0,5%). Los polifenoles que alcanzan el colon son fermentados por la microflora a ácidos fenólicos de bajo peso molecular los cuales son más biodisponibles y podrían absorberse a través del colon (Martín *et al.*, 2016; Langer *et al.*, 2011; Ackar *et al.*, 2013).

El chocolate es un producto de confitería preparado a partir de las semillas del cacao, tostado, molido y mezclado con grasa que puede ser manteca de cacao, adición azúcar, vainilla y otros aromas (Lakshmana *et al.*, 2014). El chocolate amargo tiene un porcentaje más alto de licor, el mínimo exigido de cacao es 60% y se caracteriza por su bajo contenido de azúcar (Brcanović *et al.*, 2013). Cien gramos de chocolate amargo contienen aproximadamente 100 mg de flavonoides, (Godočiková *et al.*, 2016). La planta del cacao, en la amazonia peruana, es uno de los cultivos que tiene buena producción, los granos de cacao tienen alto valor comercial por ser un producto de exportación, la industria chocolatera en el país está centrada en la producción de chocolates dulces por su alta demanda, pero muchas no son muy saludables; por lo expuesto, es el interés de promover la producción de chocolates oscuros para mejorar el aprovechamiento las propiedades funcionales del grano de cacao.

En este contexto el objetivo del presente estudio fue desarrollar chocolate oscuro con nibs de cacao fermentados y sin fermentar y evaluar los polifenoles, antocianinas, capacidad antioxidante y evaluación sensorial.

2. Materiales y métodos

Muestras: Licor de cacao se obtuvo de la Empresa Agroindustrias Makao Perú S.A.C. distrito Pucacaca, región San Martín (6°51'00.2" S y 76°20'32.0" O). Cacao Blanco de Piura (CBP) se obtuvieron de la Asociación de pequeños productores de cacao de Piura – APPROCAP, distrito de San Juan de Bigote, provincia de Morropón, región Piura. Cacao CCN-51 y

Cacao Criollo o Común (CCC) del fundo “Alborada”, Caserío Papayal, distrito Castillo Grande, provincia de Leoncio Prado, región Huánuco (9°15'16.0" S y 76°00'35.4" O).

Obtención de los nibs fermentados y no fermentados: El proceso de fermentación de los granos se realizó en una estufa con cambios de temperatura en cada remoción a 0 h (33 °C ±1 °C), 48 h (40 °C ±1 °C), 72 h (45 °C ± 1 °C) y 96h (47 °C ± 1 °C) con una última remoción a las 120h a temperatura constante. La fermentación terminó a las 144 h para lo que se realizó la prueba de fermentación, para ello seleccionamos 10 granos al azar, se cortaron por la mitad, y se evaluó que posean color marrón con estrías profundas el grano debía poseer apariencia hinchada y con tesla suelta. Se calificó como buena fermentación ≥ 7 granos que presenten estas características (Nazario *et al.*, 2013). Los granos se secaron hasta una humedad de 8% (Norma Técnica Peruana, 2006), para obtener los nibs los granos fueron tostados a 115 °C / 30 - 45 min, seguidamente el descascariado fue manual, para luego ser triturados ligeramente.

Elaboración del chocolate oscuro: la base del chocolate oscuro fue de 60% (55% de pasta de cacao, 5% de manteca de cacao), 39,5% de azúcar blanca fina y 0,5% de lecitina; esto fue conchado a 50 °C / 18 h. Luego, el mezclado con los nibs fue 7% (CBP, CCN-51 y CCC) para cada tratamiento, y el atemperado se inició entre 50 – 52 °C y descendió entre 30 – 31 °C; seguidamente la mezcla fue moldeada (eliminando burbujas de aire) y codificada, para luego ser enfriada entre 8 – 10 °C / 10-15 min, desmoldada y empacada con papel aluminio.

Preparación de extractos: Los chocolates fueron desgrasados por el método de soxhlet, para el extracto se utilizó el método reportado por Othman *et al.* (2007) con algunas modificaciones. 3 g de muestra desgrasada fueron mezclados en 30 mL de solución hidroalcohólica (50:50 etanol:agua v/v), agitado por un periodo de 24 h (Homogenizador GFL, Alemania), se filtró (Watman N° 40 - 2,5 µm) y centrifugó (Hettich-Alemania) a 10000 rpm / 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue almacenado en tubos de vidrio con tapa a -20 °C hasta el desarrollo de los análisis.

Cuantificación de polifenoles totales: Se realizó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu reportado por Velioglu *et al.* (1998) con algunas modificaciones. 20 µL de muestra (10 mg/mL) fue mezclado con 1580 µL de agua desionizada y se

adicionó 100 µL de solución Fenol de Folin-ciocalteu 2N (Merck) después de 1 min fue mezclado con 300 µL de Na₂CO₃ (Sigma Aldrich) al 20% y finalmente fue almacenado por 2 horas a temperatura ambiente. La absorbancia fue registrada a 734 nm (espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10, USA). La medida se comparó con una curva de calibración de ácido gálico (AG) (Sigma-Aldrich) en una concentración comprendida entre 0,1 a 0,8 mg/mL. El contenido de polifenoles de las muestras se reportó en g de ácido gálico equivalente (EAG)/100 g de muestra.

Cuantificación de antocianinas: Por el método de pH-diferencial (Zapata *et al.*, 2014) con algunas modificaciones. Se preparó buffer pH = 1 de cloruro de potasio 0,025 M y otro a pH = 4,5 de acetato de sodio 0,684 M. La diferencia de la absorbancia con la longitud de onda de máxima absorción (510 nm) es proporcional al contenido de antocianinas. Se mide la absorbancia a 700 nm (espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10, USA), contra un blanco de agua desionizada. La concentración de las antocianinas fue expresada en mg cianidina-3-glucósido/g muestra.

Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH): Por medio de la técnica reportada por Sandoval *et al.* (2002), 25 µL de extractos de las muestras (0,075 – 0,4 mg/mL) reaccionaron con 975 µL de DPPH (Sigma) a 100 µM en ambiente oscuro para luego registrar su absorbancia a 515 nm (Espectrofotómetro UV/VIS Genesys10, USA) después de 8 minutos en la que se observó el valor de absorbancia constante. El porcentaje de inhibición del radical DPPH fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = [(Ac-Am)/Ac] \times 100$$

Donde:

Ac: Absorbancia de control.

Am: Absorbancia de muestra (8 min).

La actividad antioxidante fue expresada en IC₅₀ que nos indica la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH. El IC₅₀ se obtuvo de la ecuación lineal obtenido del ploteo de las concentraciones de la muestra versus porcentaje de inhibición.

Radical libre 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+}): Mediante el método reportado por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones. Reaccionaron 9,8 mL de ABTS (Sigma-Aldrich) a 7,4 mM con 0,2 mL de persulfato de potasio (Merck) a 122,5 mM y se incubó en oscuridad por 16 h. Posteriormente, 1 mL

de solución de ABTS^{•+} fue diluida con 49 mL de metanol (Merck) hasta obtener una absorbancia entre 0,7 (\pm 0,02) a 734 nm (Espectrofotómetro UV/VIS Genesys 10, USA). Luego, 10 μ L de los extractos (0,01 - 0,09 mg/mL) reaccionó con 990 μ L de radical ABTS^{•+} por 6 min en un ambiente oscuro. El porcentaje de inhibición del radical y el IC₅₀ se calculó de manera similar al del radical DPPH.

Evaluación sensorial: Por el método de Leite *et al.* (2013) con algunas modificaciones, se utilizó un formato de evaluación que incluyó los atributos de color; brillo; aroma y sabor (chocolate/cacao); aroma y sabor frutal; aroma y sabor floral; amargor; acidez; astringencia; ductibilidad y granulosidad. Los calificativos fueron en base a una escala de Likert de 4 puntos (1 = ninguna y 4 = intenso) y las evaluaciones realizadas con un panel semientrenado.

Análisis estadístico: Los resultados de los análisis fueron analizados mediante un ANOVA unifactorial con la prueba de tukey con $p < 0,05$ (Hernández *et al.*, 2014), con los resultados de la evaluación sensorial se desarrolló el análisis descriptivo cuantitativo (QDA), un análisis multivariado con componentes principales (ACP) y un Cluster (dendrograma) (Franco e Hidalgo, 2003). El cálculo se realizó en el InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

3. Resultados y discusión

Cuantificación de polifenoles totales y antocianinas

El contenido de polifenoles totales en el chocolate oscuro con nibs fermentados y no fermentados (Tabla 1) presentó diferencias altamente significativas, ($p \leq 0,05$), la mayor cantidad de polifenoles totales correspondió a los chocolates con nibs CCN-51 y CBP no fermentados, esto puede deberse a que el contenido de polifenoles en los granos de cacao no fermentado esta entre 12 a 18% (peso seco) (Othman *et al.*,

2007). Así mismo, los polifenoles de los granos de cacao se encuentran en las células pigmentadas de los cotiledones (Godočiková *et al.*, 2017). Los polifenoles en granos de cacao fermentado disminuyen porque éstas se difunden en los fluidos celulares y sufren oxidación por la condensación de moléculas de taninos. Además, las pérdidas de fenoles totales durante la fermentación pueden deberse a que estos compuestos forman complejos con proteínas, polisacáridos y alcaloides (Zapata *et al.*, 2013). Por otro lado, para los chocolates oscuros con nibs no fermentados, el que mayor cantidad de polifenoles obtuvo fue CCN-51, seguido del CBP y el CCC; y las condiciones de fermentación, secado del grano y fabricación de chocolate influyeron en el contenido final de polifenoles (Di mattia *et al.*, 2013; Bordiga *et al.*, 2015); según Peláez *et al.* (2016) el contenido de polifenoles totales en granos de cacao híbrido forastero y CCN-51 no fermentado fue 7,01 g GAE / 100 g y a 168 h de fermentación $5,88 \pm 0,56$ g GAE / 100 g. Asimismo, de los chocolates oscuros sin nibs y con nibs fermentados, y no fermentados; su concentración de polifenoles totales variaron entre $2,151 \pm 0,063$ a $2,923 \pm 0,017$ g EAG / 100 g. Este rango se encuentra dentro de lo citado por Brcanović *et al.* (2013) en chocolate oscuro (7,09–31,10 mg GAE/g muestra). Godočiková *et al.* (2016) en chocolate oscuro con 78% sólidos de cacao encontraron $16,37 \pm 2,07$ mgGAE.g⁻¹ y Todorovic *et al.* (2015) en chocolate con 60-75% de cacao, $7,21 \pm 0,49$ a $12,65 \pm 0,45$ mgGAE.g⁻¹.

Con respecto a las antocianinas en el chocolate oscuro (Tabla 1), se encontró diferencia estadística ($p \leq 0,05$), el mayor contenido correspondió a los chocolates con nibs CCN-51 y CCC no fermentados. Según Vázquez-Ovando *et al.* (2016) la degradación de las antocianinas, ocurre principalmente durante la fermentación de los granos de cacao.

Tabla 1

Cuantificación de polifenoles totales y antocianinas en chocolate oscuro con nibs fermentados y no fermentados

Chocolates	Polifenoles totales g EAG/100 g	Antocianinas mg cianidin-3-glucósido/g muestra
Sin nibs	$2,351 \pm 0,066^c$	$0,026 \pm 0,003^b$
Con nibs CBP fermentado	$2,208 \pm 0,037^c$	$0,022 \pm 0,003^b$
Con nibs CCN-51 fermentado	$2,369 \pm 0,037^c$	$0,029 \pm 0,002^b$
Con nibs CCC fermentado	$2,151 \pm 0,063^c$	$0,029 \pm 0,003^b$
Con nibs CBP no fermentado	$2,738 \pm 0,046^{ab}$	$0,025 \pm 0,002^b$
Con nibs CCN-51 no fermentado	$2,923 \pm 0,017^a$	$0,072 \pm 0,002^a$
Con nibs CCC no fermentado	$2,654 \pm 0,074^b$	$0,071 \pm 0,004^a$

Los datos representan (promedio \pm error estándar) del experimento (n = 3) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos ($p \leq 0,05$).

Peláez *et al.* (2016) indica que en granos de cacao fresco híbrido forastero y CCN-51, el mayor contenido de antocianinas con sistema de remoción mecánica y manual fue $15,59 \pm 0,44$ y $13,26 \pm 0,96$ mg de cianidina-3-glucósido/g de cacao, respectivamente. En granos de cacao sin fermentar la antocianina varió entre 0,59 a 1,60 mg/g y 0,27 a 1,05 mg/g en granos fermentados (Zapata *et al.*, 2013). El chocolate oscuro sin nibs fue estadísticamente igual a los chocolates con nibs CBP, CCN-51 y CCC fermentado; y CBP no fermentado. Cabe aclarar que el grano del CBP no tiene color. Bordiga *et al.* (2015) indica que los granos frescos de cacao contienen pigmentos de antocianinas (color violeta) y durante la fermentación estos son hidrolizados por glucósidos resultando un cambio del color del cotiledón de violeta a marrón. Finalmente, el chocolate oscuro sin nibs y con nibs fermentados, y no fermentados; la antocianina varió entre $0,022 \pm 0,003$ a $0,072 \pm 0,002$ mg cianidin-3-glucósido/g muestra. Según Bordiga *et al.* (2015) reportó en chocolate oscuro elaborado con granos de diferentes países el contenido de antocianinas vario 2,04 - 3,40 μg cianidin-3-galactoside eq.g⁻¹. Todorovic *et al.* (2015) indica el contenido de proantocianidinas en chocolate oscuro vario $3,68 \pm 0,03$ a $1,77 \pm 0,08$ mg equivalente Cyanidina cloruro (CyE)/g.

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante está asociada a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno y estos antioxidantes reaccionan con el DPPH (Xi *et al.*, 2011; Ibrić y Čavar, 2014). La mayor capacidad de inhibir al radical DPPH (IC₅₀) (Tabla 2) lo tuvieron los chocolates con nibs CCN-51, CCC y CBP no fermentados; cabe indicar que estos también tuvieron el mayor contenido de polifenoles totales. Según Brčanović *et al.* (2013) la actividad antioxidante del chocolate oscuro y cacao está determinada por el contenido de flavonoles como (-) epicate-

quina y (+) catequina, entre otros oligómeros conocidos como proantocianidinas. Por otro lado, la menor eficiencia frente al radical DPPH lo presentaron los chocolates sin nibs, con nibs CBP, CCN-51 y CCC fermentado puesto que durante la fermentación de los granos de cacao se tuvo una disminución no lineal del índice de polifenoles totales Di mattia *et al.* (2013) y la actividad antioxidante se correlaciona con el contenido de compuestos fenólicos presentes en el cacao (Ibrić y Čavar, 2014). Por otro lado, el chocolate oscuro sin nibs y con nibs fermentados y no fermentados el IC₅₀ varió entre $0,172 \pm 0,002$ a $0,245 \pm 0,014$ mg/mL, cabe indicar que los resultados fueron mucho mejores que lo reportados por Vertuani *et al.* (2014) en chocolate oscuro IC₅₀ $0,28 \pm 0,01$ mg/mL. Bordiga *et al.* (2015) chocolate oscuro IC₅₀ 175 – 240 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y Da silva *et al.* (2015) el chocolate oscuro presentó una alta concentración de polifenoles totales y el IC₅₀ fue más bajo frente al DPPH, IC₅₀ $10,43 \pm 1,39$ $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los chocolates presentaron diferencia estadística ($p \leq 0,05$) al inhibir al radical ABTS^{•+} (Tabla 2), podemos indicar que la mayor eficiencia lo presentaron los chocolates con nibs CCN-51, CCC y CBP no fermentado; según Godočkivá *et al.* (2016) los productos de chocolate y cacao son una rica fuente de flavonoides, estos son compuestos polifenólicos naturales y representan hasta el 20% de los compuestos presentes en los granos de cacao. Por otra parte, la menor actividad frente al radical ABTS^{•+} lo presentó el chocolate sin nibs y fue estadísticamente igual a los chocolates con nibs CBP, CCN-51 y CCC fermentado.

Oracz *et al.* (2015) indica que los polifenoles y la actividad antioxidante son más altos en los granos de cacao sin fermentar que en las muestras fermentadas, esta reducción está relacionada con la oxidación no enzimática o enzimática de las catequinas a quinonas. Así mismo, la actividad antioxidante del cacao puede ser afectada por los cambios que ocurren en el grano y su procesamiento Godočkivá *et al.* (2016).

Tabla 2

Capacidad antioxidante de chocolate amargo con nibs fermentados y no fermentados

Chocolates	Capacidad antioxidante IC ₅₀ (mg/mL)	
	DPPH	ABTS ^{•+}
Sin nibs	$0,239 \pm 0,008^a$	$0,075 \pm 0,002^a$
Con nibs CBP fermentado	$0,234 \pm 0,007^{ab}$	$0,072 \pm 0,003^a$
Con nibs CCN-51 fermentado	$0,238 \pm 0,012^a$	$0,065 \pm 0,002^{abc}$
Con nibs CCC fermentado	$0,245 \pm 0,014^a$	$0,066 \pm 0,004^{ab}$
Con nibs CBP no fermentado	$0,196 \pm 0,004^{bc}$	$0,055 \pm 0,002^{bc}$
Con nibs CCN-51 no fermentado	$0,172 \pm 0,002^c$	$0,053 \pm 0,002^c$
Con nibs CCC no fermentado	$0,189 \pm 0,004^c$	$0,054 \pm 0,002^c$

Los datos representan (promedio \pm error estándar) del experimento (n=3) valores de una misma columna con superíndices diferentes son significativos ($p \leq 0,05$).

En el chocolate oscuro sin nibs y con nibs fermentados y no fermentados varió entre IC₅₀ 0,053 a 0,075 mg/mL, Viluzca et al. (2012) reportó actividad antioxidante en chocolate oscuro 70% y 46% cacao mediante método ABTS⁰⁺ fue 111,35 y 98 mmTrolox.L⁻¹ respectivamente.

Evaluación sensorial

En la Figura 1 se presenta el analisis descriptivo cuantitativo (QDA), el mejor color lo presentó el chocoalte sin nibs; según Lakshmana et al. (2014), el chocolate oscuro generalmente tiene altos porcentajes de cacao que van del 70% al 99% mientras mayor sea el porcentaje de cacao más oscura será el chocolate.

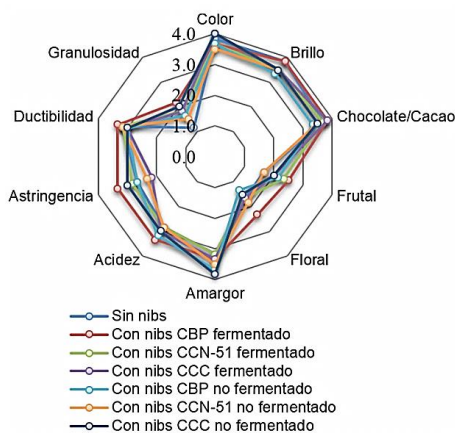


Figura 1. Perfil sensorial de las muestras de chocolate oscuro de 60% con nibs fermentados y no fermentados.

Con respecto al aroma y sabor chocolate/cacao la muestra con menor puntaje fueron los chocolates con nibs CBP, CCN-51 y CCC no fermentado, esto puede deberse a que los granos de cacao sin

fermentar tienen un color gris oscuro y son más astringente y amargos y desarrollan poco sabor y aroma a chocolate (González et al., 2012; Aprotosoie et al., 2016). Con respecto al aroma y sabor frutal fue mejor el chocolate con nibs CBP fermentado; en los granos de cacao fermentados los compuestos mas representativos son ácido acético, tetramethylpyrazina y 2,3-butanediol (Machado et al., 2018). El menor calificativo en el aroma y sabor floral correspondió al chocolate con nibs CBP no fermentado, este comportamiento puede atribuirse a que los granos sin fermentar se caracterizan por una astringencia y amargura y el perfil de sabor de cacao y chocolate se desarrolla durante el procesamiento postcosecha que incluyen fermentación, secado y tostado (Aprotosoie et al., 2016). Fueron calificados como chocolates amargos los chocolates con nibs CBP, CCN-51 y CCC no fermentado, pero todos los chocolates fueron calificados de poseer una acidez moderada.

Los polifenoles están positivamente correlacionados con la astringencia y amargura, y negativamente con la característica a frutado (Bordiga et al., 2015). Los chocolates tuvieron ductibilidad moderada, Lakshmana et al. (2014) indica que los chocolates deben ser sólidos a 20 – 27 °C y derretirse levemente a temperatura corporal (37 °C) por que el punto de fusión de la mantaca esta alrededor de 34 – 38 °C. El chocolate sin inclusión de nibs fue calificado como carente de granulosidad y los que tuvieron la inclusión de nibs fueron calificados con leve granulosidad, Torres (2012) indica que el tamaño de partículas en los chocolates provoca arenosidad cuando se come.

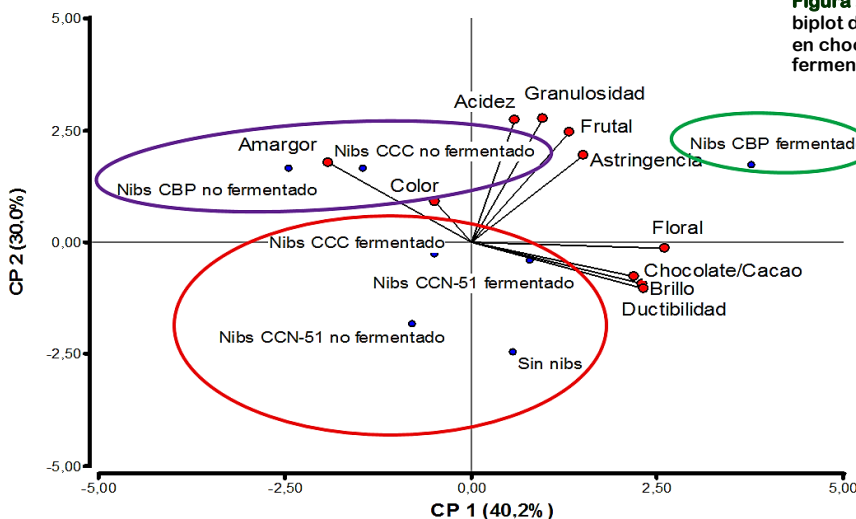


Figura 2. Comportamiento del biplot de la evaluación sensorial en chocolate oscuro con nibs fermentados y no fermentados.

La evaluación sensorial referido al perfil de atributos en el chocolate oscuro, fueron analizados mediante componente principales, en el biplot de variables del primer componente (CP1) separa el atributo amargor de las demás variables, el cual representa el 40,2% de la variabilidad total del perfil sensorial (Figura 2). Por otro lado, el atributo granulosidad del chocolate representa el 30,0% de la variabilidad del segundo componente (CP2) y en general ambos componentes representan el 70,2% de la variabilidad total. De los resultados podemos indicar que el amargor se acentuó en los chocolates con nibs, según Qin *et al.* (2017) la fermentación del grano de cacao y el secado contribuye a desarrollar sabores de cacao-chocolate al aumentar los niveles de aminoácidos y azúcares, los niveles de compuestos volátiles de cacao formados durante la torrefacción varían directamente con el tiempo de fermentación del grano. Además, existe la evidencia sobre el efecto que ejerce la fermentación insuficiente de los granos sobre la expresión del sabor del cacao y demás rasgos sensoriales (Solórzano *et al.*, 2015). El atributo de granulosidad fue resaltado en los chocolates con nibs fermentados y no fermentados; es también importante el tamaño de las partículas en el chocolate ya que la sensación suave de la muestra en la boca es parte del atractivo de este producto (Alvis *et al.*, 2011).

Según el análisis de conglomerados podemos diferenciar tres grupos (Figura 3); el primero representa el 57,1% (chocolates sin nibs, con nibs CCN-51 no fermentado, CCC y CCN-51 fermentado); fueron calificados con color y brillo, aroma y sabor chocolate/cacao “intenso”, ductibilidad, amargor y acidez “moderado”, astringencia “leve-moderado”, los atributos desarrollados en los chocolates de este grupo fueron mejor que los dos grupos restantes, Fernández *et al.* (2014) indica que los polifenoles, determinan importantes propiedades organolépticas del chocolate como el amargor final.

El segundo grupo representa el 28,6% estuvo conformado por los chocolates con nibs CBP y CCC no fermentados, tuvieron color “intenso”, brillo, aroma y sabor chocolate/cacao, acidez, astringencia y ductibilidad “moderado” y amargor “intenso”. El tercer grupo representa el 14,3% corresponde al chocolate con nibs CBP fermentado, fue calificado con color, brillo, aroma y sabor chocolate/cacao “intenso”, aroma y sabor frutal, amargor, acidez, astringencia y ductibilidad “moderado”;

Zapata *et al.* (2013) en la fermentación sucede una reducción de la astringencia y sabor amargo.

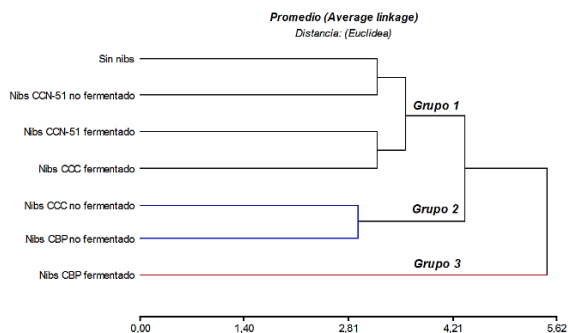


Figura 3. Presentación del análisis de conglomerados de las muestras de chocolate oscuro con nibs fermentados y no fermentados.

4. Conclusiones

El mayor contenido de polifenoles totales y antocianinas se encontró en los chocolates con inclusión de nibs no fermentados de cacao CCN-51, CBP y CCC y el menor correspondió a los nibs fermentados. La capacidad antioxidante frente al radical DPPH (IC₅₀ 0,172 a 0,245 mg/mL) y frente al radical ABTS^{•+} (IC₅₀ 0,053 a 0,075 mg/mL) fue mejor en chocolate oscuro con inclusión de nibs CCN-51, CCC y CBP no fermentados. Para un chocolate con buenas características sensoriales utilizar nibs fermentados, pero si prefiere que sea funcional incluir nibs no fermentados. Por lo tanto, se recomienda promover el consumo de los chocolates con inclusión de nibs no fermentados para aprovechar sus propiedades antioxidantes.

Referencias bibliográficas

- Ackar, D.; Lendić, K.V.; Valek, M.; Šubarić, d.; Miličević, B.; Babić, J.; Nedić, I. 2013. Cocoa polyphenols: Can we consider cocoa and chocolate as potential functional food?. *Journal of Chemistry* 2013: 1-7.
- Alvis, A.; Pérez, L.; Arrazola, G. 2011. Determinación de las propiedades de textura de tabletas de chocolate mediante técnicas instrumentales. *Información Tecnológica* 22(3): 11-18.
- Aprotosoia, A.C.; Luca, S.V.; Miron, A. 2016. Flavor chemistry of cocoa and cocoa Products-An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15: 73-91.
- Beišćak-Cvitanović, A.; Komes, D.; Durgo, K.; Vojvodić, A.; Bušić, A. 2015. Nettle (*Urtica dioica* L.) extracts as functional ingredients for production of chocolates with improved bioactive composition and sensory properties. *Journal Food Scientists & Technologists* 52(12): 1-12.
- Bordiga, M.; Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coisson, J.D.; Mazza, G.; Arlorio, M. 2015. Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate. *International Journal of Food Science and Technology* 50: 840-848.

- Brcanović, J.M.; Pavlović, A.N.; Mitić, S.; Stojanović, G.S.; Manojlović, D.D.; Kaličanin, B.M.; Veljković, J.N. 2013. Cyclic voltammetric determination of antioxidant capacity of cocoa powder, dark chocolate and milk chocolate samples: Correlation with spectrophotometric assays and individual phenolic compounds. *Food Tech. and Biotech* 51(4): 460-470.
- Da Silva, M.N.; Koslowsky, M.R.; Farias, W.M.; Funchal, C.; Dani, C. 2015. Total phenolic content and antioxidant activity of different types of chocolate, milk, semisweet, dark, and soy, in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of wistar rats. *Biochemistry Research International* 215: Article ID 294659.
- Di Mattia, C.; Maria Martuscelli, M.; Sacchetti, G.; Scheirlinck, I.; Beheydt, B.; Mastrocola, D.; Pittia, P. 2013. Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food Bioprocess Technol* 6: 3420–3432.
- Fernández, V.; Yee, A.; Sulbarán, B.; Peña, J. 2014. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en chocolates comerciales venezolanos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 31: 129-144
- Franco, T.L.; Hidalgo, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Boletín técnico IPGRI*. 90 pp.
- Godočiková, L.; Ivanišová, E.; Kačániová, M. 2017. The influence of fortification of dark chocolate with sea buckthorn and mulberry on the content of biologically active substances. *Advanced Research in Life Sciences* 1(1): 26-31.
- Godočiková, L.; Ivanišová, E.; Árvay, J.; Petrová, J.; Kačániová, M. 2016. The comparison of biological activity of chocolates made by different technological procedures. *Potravinarstvo Scientific Journal for Food Industry* 10(1): 316-322.
- González, M.Y.; Pérez, S.E.; Palomino, C.C. 2012. Factores que inciden en la calidad sensorial del chocolate. *Actualización en Nutrición* 13(4): 314-331.
- Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. 2014. Metodología de la investigación. 5 Ed. D.F., México, McGraw-Hill Interamericana. 839 pp.
- Ibrić, A.; Čavar, S. 2014. Phenolic compounds and antioxidant activity of cocoa and chocolate products. *Bulletin of the Chem. and Tec. of Bosnia and Herzegovina* 42: 37-40.
- Lakshmana, R.A.; Haritha, R.K.; Kalyani L. 2014. Health benefits of dark chocolate. *Journal of Advanced Drug Delivery* 1(4): 184-195
- Langer, S.; Marshall, L.J.; Day, A.J.; Morgan, M.R. 2011. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: A study of the correlation with nonfat cocoa solids. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 59: 8435-8441.
- Leite, P.B.; Bispo, da Silva; De Santana, L.R. 2013. Sensory profiles of chocolates produced from cocoa cultivars resistant to *Monilophthora Perniciosa*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35(2): 594-602.
- Machado, C.L.; Ordoñez E.Cl.; Ángel, S.Y.; Guaca, C.L.; Suárez, S.J. 2018. Organoleptic quality assessment of *Theobroma cacao* L. in cocoa farms in northern Huila, Colombia. *Acta Agron.* 67(1): 46-52.
- Martin, M.A.; Goya, L.; Ramos, S. 2016. Preventive effects of cocoa and cocoa antioxidants in colon cancer. *Journal Diseases* 4(1): 1-14.
- Nazario, I.O.; Ordoñez, G.E.; Mandujano, Y.; Arevalo, J. 2013. Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante en granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. *Investigación y Amazonia* 3(1): 51-59.
- Oracz, J.; Nebesny, E.; Dorota-Zyzelewicz, D. 2015. Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups affected by roasting conditions. *Eur Food Res Technol* 241: 663-681.
- Othman, A.; Ismail, A. G.; Adenan, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* 100: 1523-1530.
- Peláez, P.P.; Guerra, S.; Contreras, D. 2016. Changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer, between fermentation boxes. *Scientia Agropecuaria* 7(2): 111 – 119.
- Qin, X-W.; Lai, J-X.; Tan, L-e.; Hao, Ch-Y.; Li, F-P.; He, S-Z.; Song, Y-H. 2017. Characterization of volatile compounds in Criollo, Forastero, and Trinitario cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) in China. *International journal of food properties* 20(10): 2261-2275.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9/10): 1231-1237.
- Sandoval, M.; Okuhama, N.N.; Angeles, F.M.; Melchor, V.V.; Condezo, L.A.; Lao, J.; Miller, M.J. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry* 79: 207-213.
- Solórzano, Ch.E.; Amores, P.F.; Jiménez, B.J.; Nicklin, Cl.; Barzola, M.S. 2015. Comparación sensorial del cacao (*Theobroma cacao* L.) Nacional fino de aroma cultivado. *Ciencia y Tecnología* 8(1): 37-47.
- Todorovic, V.; Redovnikovic, I.R.; Todorovic, Z.; Jankovic, G.; Dodevska, M.; Sobajic, S. 2015. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *J. of Food Composition and Analysis* 41: 137-143.
- Torres, M.M. 2012. Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro. Tesis de Doctorado, Universitat Rovira I Virgili.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Journal Nutrients* 2: 1231-1246.
- 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. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 66(3): 239-254.
- Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5113-4117.
- Vertuani, S.; Scalambra, E.; Vittorio, T.; Malisardi, G.; Baldisserotto, A.; Manfredini, S. 2014. Evaluation of antiradical activity of different cocoa and chocolate products-relation with lipid and protein composition. *Journal of Medicinal Food* 17(4): 512-516.
- Viluzca, F.; Yee, A.; Sulbarán, B.; Berradre, M.N. 2012. Actividad antioxidante de chocolates comerciales venezolanos. *Vitae* 19(Supl. 1): S448- S450.
- Xi, J.; Shen, D.; Li, Y.; Zhang, R. 2011. Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods. *International Journal of Pharmaceutics* 408: 97-101.
- Zapata, L.M.; Heredia, A.M.; Quinteros, C.F.; Malleret, A.D.; Clemente, G.; Cárcel, J.A. 2014. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 25(49): 166-192.
- Zapata, S.; Tamayo T.A.; Rojano, B. 2013. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Rev. Cubana de Plantas Medicinales* 18(3): 391-404.