

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES,
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE (+)-CATEQUINA y (-)-
EPICATEQUINA CON EL PORCENTAJE DE SÓLIDOS DE CACAO EN
CHOCOLATES COMERCIALES, AREQUIPA 2023**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Amésquita Nolasco, Xiomara Angela
Gutiérrez Portilla, Jessica Paulette**

Para optar el Título Profesional de:
Químico Farmacéutico

Asesor:
PhD. Cárdenas García Jaime Dante

Arequipa –Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 14 de Julio del 2023

Dictamen: 008119-C-EPFyB-2023

Visto el borrador del expediente 008119, presentado por:

2017203972 - AMESQUITA NOLASCO XIOMARA ANGELA

2017222332 - GUTIERREZ PORTILLA JESSICA PAULETTE

Titulado:

**CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES, CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE (+)-CATEQUINA Y (-)-EPICATEQUINA CON EL PORCENTAJE
DE SÓLIDOS DE CACAO EN CHOCOLATES COMERCIALES, AREQUIPA 2023**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29526420 - RAMIREZ ORELLANA JUAN ANDRES
DICTAMINADOR**



**40617097 - NIETO MONTESINOS RITA MILAGROS
DICTAMINADOR**



**44327250 - MEDINA PEREZ JEANETH MARISOL
DICTAMINADOR**



CORRELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE (+)-CATEQUINA y (-)- EPICATEQUINA CON EL PORCENTAJE DE SÓLIDOS DE CACAO EN CHOCOLATES COMERCIALES, AREQUIPA

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
3	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	repositorio.unemi.edu.ec Fuente de Internet	1%
5	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
7	purl.org Fuente de Internet	1%

8

polodelconocimiento.com

Fuente de Internet

1 %

9

Submitted to Universidad Catolica De Cuenca

Trabajo del estudiante

1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

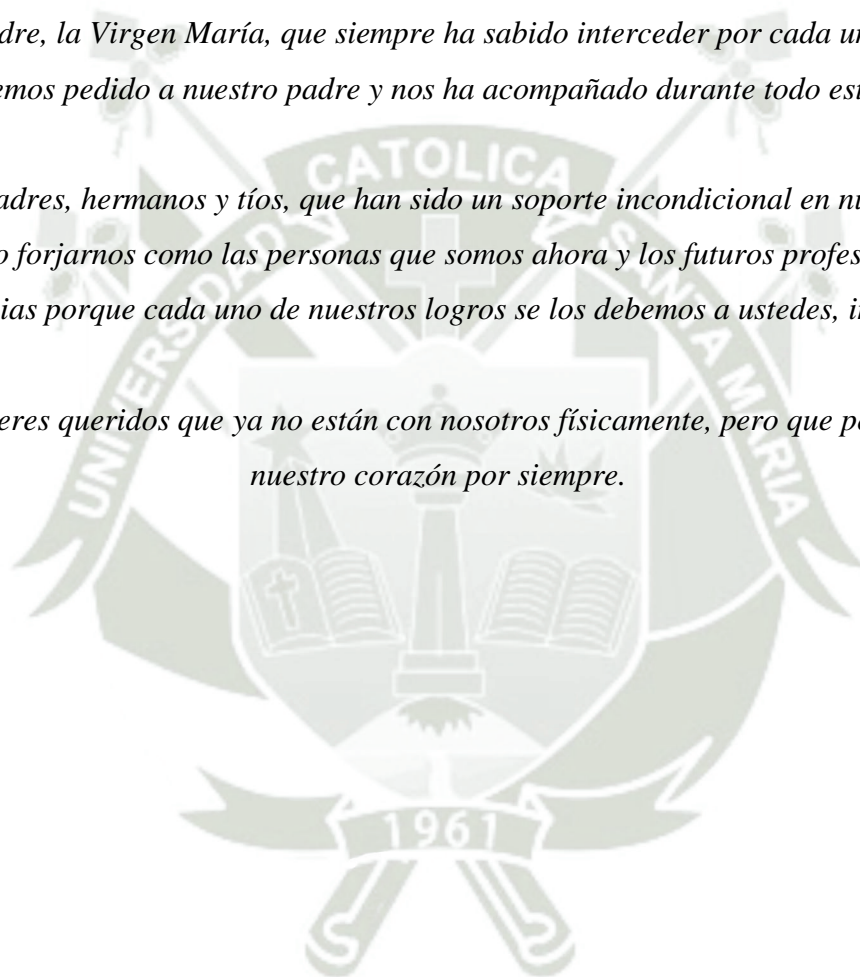
DEDICATORIA

A Dios, por habernos permitido llegar hasta este punto y habernos guiado en cada uno de los pasos que hemos dado durante estos seis años de carrera, ya que nunca nos ha dejado solas y siempre con su infinito amor y bondad ha sabido consolarnos hasta en los momentos más difíciles.

A nuestra madre, la Virgen María, que siempre ha sabido interceder por cada una de las cosas que le hemos pedido a nuestro padre y nos ha acompañado durante todo este camino.

A nuestros padres, hermanos y tíos, que han sido un soporte incondicional en nuestras vidas y han sabido forjarnos como las personas que somos ahora y los futuros profesionales que seremos, gracias porque cada uno de nuestros logros se los debemos a ustedes, incluyendo este.

A nuestros seres queridos que ya no están con nosotros físicamente, pero que permanecen en nuestro corazón por siempre.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento a Dios, por su amor incondicional y constante protección en cada paso de nuestras vidas. ¡A Dios, nuestra eterna gratitud!

A nuestros queridos padres y familiares, por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento y por creer en nosotras en los pasos que hemos dado a lo largo de nuestras vidas.

A nuestro asesor, PhD. Jaime Cárdenas García por su apoyo constante y brindarnos todos sus conocimientos durante la elaboración de esta tesis.

A los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por la dedicación y enseñanzas a lo largo de estos años.

A nuestras amistades que han compartido la carrera con nosotras desde el primer hasta el último año, gracias por compartir desafíos, risas y momentos inolvidables en este camino académico y a aquellos que no han sido parte de nuestra vida académica, gracias por su amistad sincera y por estar presentes en cada etapa de nuestras vidas.

Al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, por brindarnos un grato lugar para realizar nuestro internado y apoyarnos en el desarrollo de esta tesis, sobre todo al Dr. Ricardo Abril, Ing. Rodrigo Ramos y Mgter. Tiffany Vincent que no solo compartieron sus conocimientos, sino que también los valiosos momentos a lo largo de esta travesía.

RESUMEN

El cacao es el ingrediente principal para la elaboración de chocolate, responsable de sus propiedades funcionales, pues posee altos niveles de compuestos, como catequinas y procianidinas, a las cuales se les atribuyen efectos benéficos para la salud. Por esta razón, muchas personas optan por consumir chocolate; sin embargo, es importante tener en cuenta que la cantidad y calidad de estos polifenoles pueden variar entre diferentes marcas y tipos de chocolate.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la correlación entre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina con el porcentaje de sólidos de cacao en chocolates comerciales. Para ello se obtuvieron doce marcas de chocolate y se adquirieron tres lotes diferentes de cada marca, que fueron agrupados en cuatro categorías: A (30 % - 44 %) B (45 % - 59 %) C (60 % - 74 %) y D (75 % - 90 %) de acuerdo con el porcentaje de sólidos de cacao declarado en la etiqueta. Cada muestra fue desengrasada y posteriormente se preparó un extracto metanólico que fue utilizado en los diferentes ensayos.

Para determinar el contenido de polifenoles totales (TPC), se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar; para la capacidad antioxidante (TAC) se evaluó mediante el método de CUPRAC, utilizando trolox como estándar y para el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando (+)-catequina y (-)-epicatequina como estándares de referencia.

En cuanto al TPC, se encontraron los siguientes resultados para cada grupo de estudio: grupo A (30 % - 44 %): 27.725 mg GA/g, grupo B (45 % - 59 %): 80.426 mg GA/g, grupo C (60 % - 74 %): 128.629 mg GA/g y grupo D (75 % - 90 %): 122,015 mg GA/g. En cuanto al TAC, se obtuvieron los siguientes resultados: grupo A: 162.470 mg TE/g, grupo B: 432.586 mg TE/g, grupo C: 850.166 mg TE/g y grupo D: 803.198 mg TE/g. Para la cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina, primero se realizó una estandarización del método, en el cual se evaluaron los parámetros de: linealidad, precisión y exactitud. Se trabajó con una gráfica de calibración en un rango de 50 a 300 mg/L con soluciones estándar de (+)-catequina y (-)-epicatequina, obteniéndose los siguientes resultados: un factor de correlación R^2 de 0.9991 y 0.9992, respectivamente; una precisión con un C.V. de 0.36 para (+)-catequina y 0.56 para (-)-epicatequina en el criterio de repetibilidad y 1.68 para (+)-catequina y 1.44 para (-)-epicatequina en el criterio de reproducibilidad; y por último en exactitud con un %R = 91.53 para (+)-catequina y 91.12 para (-)-epicatequina. Se determinó el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina, registrándose los

siguientes valores: grupo A: 2.859 mg C + EC/g, grupo B: 5.233 mg C + EC/g, grupo C: 8.858 mg C + EC/g y grupo D: 9.669 mg C + EC/g.

Para evaluar la correlación entre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina se utilizó la prueba de correlación de Pearson. Los resultados indicaron una correlación altamente significativa entre los niveles de polifenoles totales y la capacidad antioxidante, con un valor de correlación promedio (r) de 0.998 y un valor p de 0.0327 para todos los grupos. Con respecto a la relación entre polifenoles totales y capacidad antioxidante con el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina, se obtuvo un valor de correlación promedio (r) de 0.946 y un valor p de 0.174, el cual indica que hay una fuerte correlación entre las variables pero que no llegaría a ser estadísticamente significativa. Es importante resaltar que estos resultados se ven influenciados por varios factores, como el tipo de cacao utilizado, las condiciones durante la fermentación, secado, tostado, procesamiento, almacenamiento y el proceso de elaboración de chocolate.

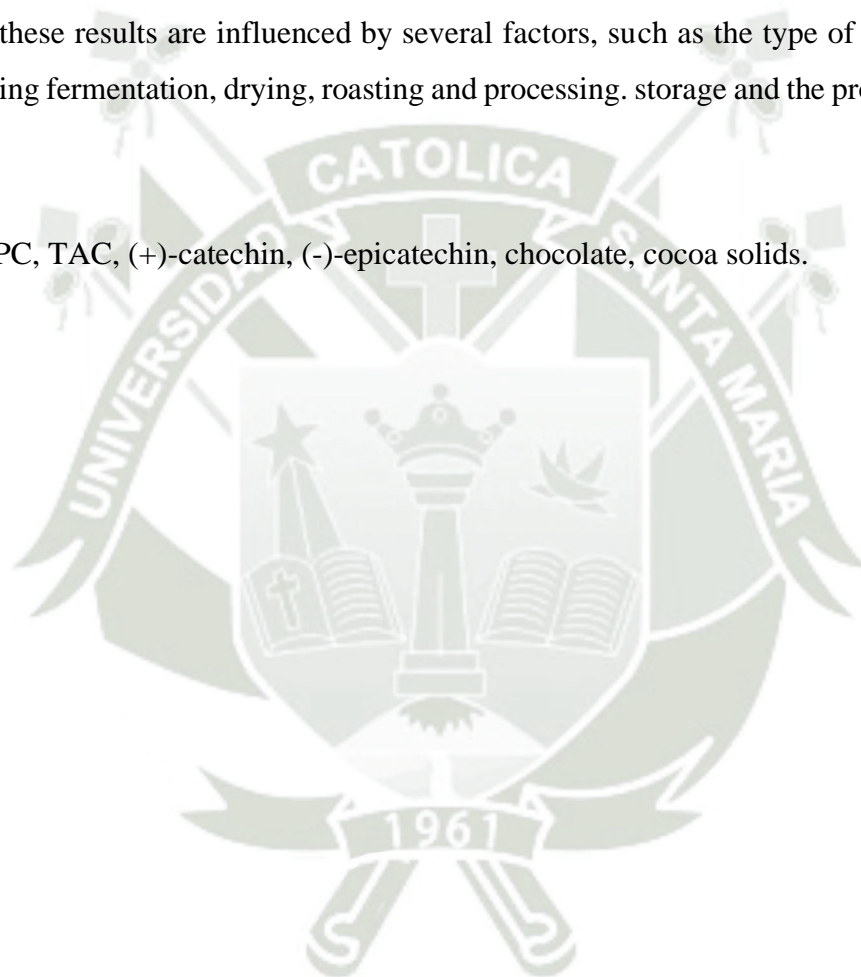
Palabras claves: TPC, TAC, (+)-catequina, (-)-epicatequina, chocolate, sólidos de cacao.

ABSTRACT

Cocoa is the main ingredient for the production of chocolate, responsible for its functional properties, since it has high levels of compounds, such as catechins and procyanidins, to which beneficial health effects are attributed. For this reason, many people choose to consume chocolate; however, it is important to note that the quantity and quality of these polyphenols can vary between different brands and types of chocolate. The objective of this research work was to evaluate the correlation between the content of total polyphenols, antioxidant capacity and content of (+)-catechin and (-)-epicatechin with the percentage of cocoa solids in commercial chocolates. For this, twelve brands of chocolate were obtained and three different batches of each brand were purchased, which were grouped into four categories: A (30% - 44%) B (45% - 59%) C (60% - 74%) and D (75% - 90%) based on the percentage of cocoa solids declared on the label. Each sample was defatted and subsequently a methanolic extract was prepared that was used in the different tests. To determine the content of total polyphenols (TPC), the Folin-Ciocalteu method was used, using gallic acid as the standard; for the antioxidant capacity (TAC) it was evaluated by the CUPRAC method, using trolox as standard and for the content of (+)-catechin and (-)-epicatechin it was carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using (+)-catechin and (-)-epicatechin as reference standards. Regarding TPC, the following results were found for each study group: group A (30% - 44%): 27,725 mg AG/g, group B (45% - 59%): 80,426 mg AG/g, group C (60% - 74%): 128.629 mg AG/g and group D (75% - 90%): 122.015 mg AG/g. Regarding the TAC, the following results were obtained: group A: 162.470 mg TE/g, group B: 432.586 mg TE/g, group C: 850.166 mg TE/g and group D: 803.198 mg TE/g. For the quantification of (+)-catechin and (-)-epicatechin, first a standardization of the method was carried out, in which the parameters of: linearity, precision and accuracy were evaluated. A calibration graph was used in a range of 50 to 300 mg/L with standard solutions of (+)-catechin and (-)-epicatechin, obtaining the following results: an R^2 correlation factor of 0.9991 and 0.9992, respectively; an accuracy with a C.V. of 0.36 for (+)-catechin and 0.56 for (-)-epicatechin in the repeatability criterion and of 1.68 for (+)-catechin and 1.44 for (-)-epicatechin in the criterion of reproducibility; and finally in precision with a %R = 91.53 for (+)-catechin and 91.12 for (-)-epicatechin. The content of (+)-catechin and (-)-epicatechin was determined, registering the following values: group A: 2,859 mg C + EC/g, group B: 5,233 mg C + EC/g, group C: 8,858 mg C + CE/g and group D: 9,669 mg C + CE/g. To evaluate the correlation between the content of

total polyphenols, the antioxidant capacity and the content of (+)-catechin and (-)-epicatechin, the Pearson correlation test was used. The results indicated a highly significant correlation between total polyphenol levels and antioxidant capacity, with an average correlation value (r) of 0.998 and a p value of 0.0327 for all groups. Regarding the relationship between total polyphenols and antioxidant capacity with the content of (+)-catechin and (-)-epicatechin, an average correlation value (r) of 0.946 and a p value of 0.174 were obtained, which indicates that there is a strong correlation between the variables but it would not be statistically significant. It is important to highlight that these results are influenced by several factors, such as the type of cocoa used, the conditions during fermentation, drying, roasting and processing. storage and the process of making chocolate.

Keywords: TPC, TAC, (+)-catechin, (-)-epicatechin, chocolate, cocoa solids.

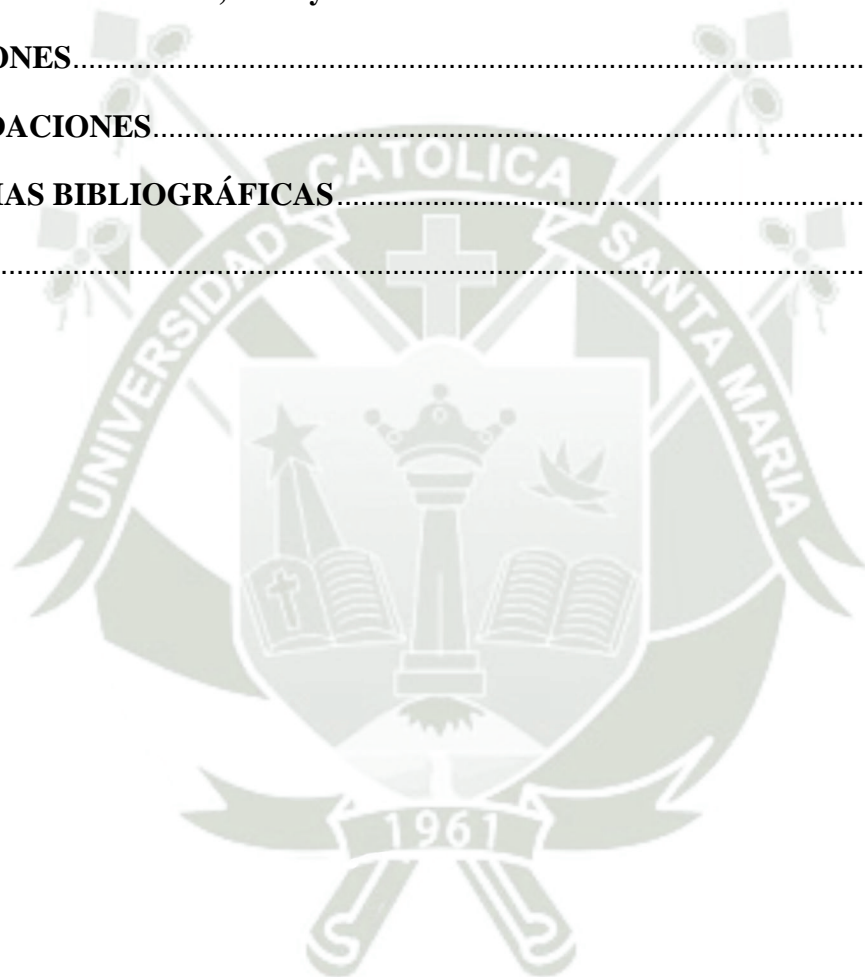


ÍNDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	5
1. Chocolate	6
1.1. Cacao	6
1.2. Taxonomía del cacao	6
1.3. Procesamiento del grano de cacao para la obtención de nibs de cacao	7
1.4. Elaboración de chocolate	9
1.5. Tipos de chocolate	12
1.6. Propiedades y beneficios del chocolate	14
2. Antioxidantes	15
2.1. Clasificación	15
2.2. Compuestos fenólicos	15
2.3. Radicales Libres	22
2.4. Estrés Oxidativo	23
2.5. Determinación de la actividad antioxidante por el método de CUPRAC	23
3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	24
3.1. Definición	24

3.2. Componentes básicos.....	24
3.3. Tipos de cromatografía	26
4. Validación de técnicas analíticas	27
4.1. Tipos de validación.....	27
4.2. Criterios de estandarización (normalización, validación menor o verificación)	27
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
LUGAR DE INVESTIGACIÓN	30
MATERIALES	30
Equipos de laboratorio:.....	30
Materiales de laboratorio.....	30
Reactivos químicos	31
MÉTODOS	31
1. Obtención de la muestra.....	31
2. Tratamiento de la muestra	32
3. Obtención del extracto.....	32
4. Determinación del contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu)	33
5. Determinación de la capacidad antioxidante (CUPRAC)	34
6. Determinación de catequina y epicatequina por HPLC	35
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1. Obtención de la muestra.....	42
2. Determinación del contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)	42
2.1. Gráfica de calibración	42
2.2. Cuantificación de fenoles totales en chocolates.....	44
3. Determinación de la capacidad antioxidante (CUPRAC)	48
3.1. Gráfica de calibración	48

3.2. Cuantificación de capacidad antioxidante en chocolates.....	50
4. Determinación de catequina y epicatequina por HPLC.....	54
4.1. Tiempo de retención.....	54
4.2. Estandarización del método analítico.....	54
4.3. Cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina en chocolates.....	63
5. Correlación entre TPC, TAC y C + EC.....	68
CONCLUSIONES.....	72
RECOMENDACIONES.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	83



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Flujograma del proceso de elaboración de chocolate.....	11
Figura 1.2 Estructuras químicas de los diferentes compuestos fenólicos.....	18
Figura 1.3 Estructuras químicas de los principales tipos de catequinas.....	19
Figura 1.4 Estructuras químicas de catequina y epicatequina.....	20
Figura 1.5 Principales mecanismos de acción de los compuestos fenólicos.....	21
Figura 1.6 Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.....	22
Figura 1.7 Mecanismo de acción del ensayo de CUPRAC.....	24
Figura 1.8 Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento.....	26
Figura 3.1 Muestras de chocolate.....	42
Figura 3.2 Estándares de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.....	43
Figura 3.3 Gráfica de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu (k = 3).....	44
Figura 3.4 Concentración de TPC en mg GA/g en las muestras.....	46
Figura 3.5 Estándares de trolox por el método de CUPRAC.....	48
Figura 3.6 Gráfica de calibración de trolox por el método CUPRAC (k = 3).....	49
Figura 3.7 Concentración de TAC en mg TE/g en las muestras.....	51
Figura 3.8 Cromatograma del tiempo de retención de (+)-catequina y (-)-epicatequina en HPLC.....	54
Figura 3.9 Gráfica de calibración de (+)-catequina en HPLC (k = 3).....	55
Figura 3.10 Gráfica de calibración de (-)-epicatequina en HPLC (k = 3).....	55
Figura 3.11 Cromatogramas de la gráfica de calibración de (+)-catequina y (-)-epicatequina en HPLC.....	56
Figura 3.12 Concentración de C + EC en las muestras.....	66

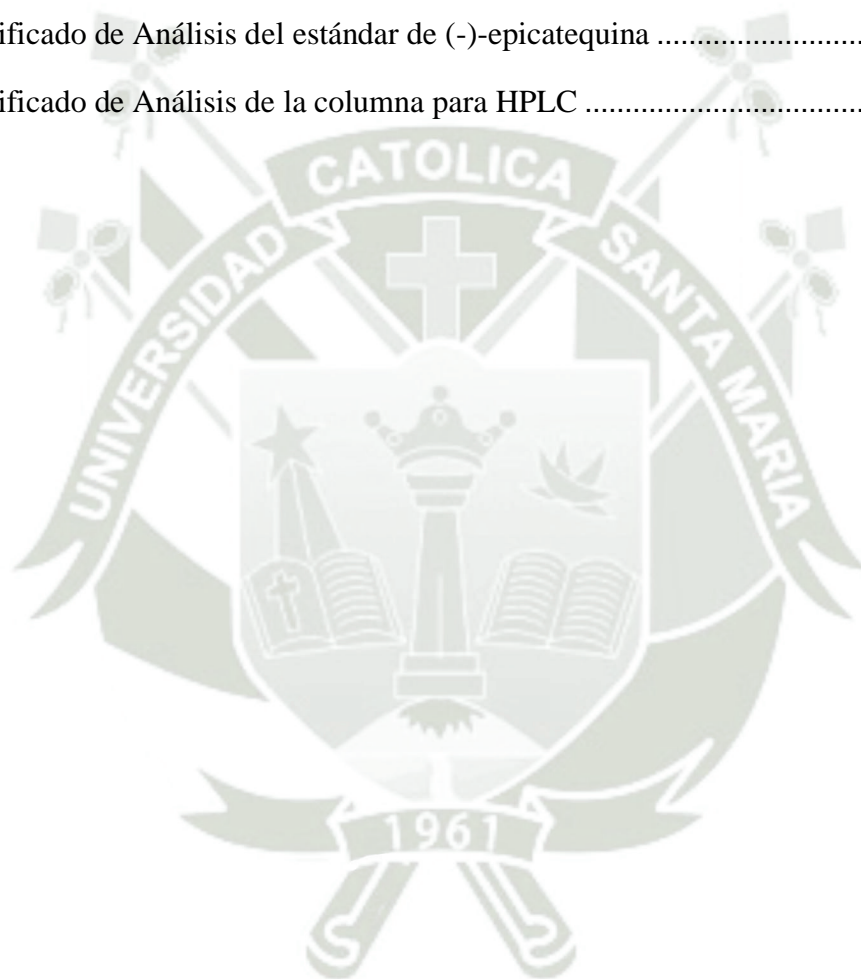
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica del cacao.....	6
Tabla 1.2 Tipos de chocolate	12
Tabla 1.3 Clasificación de los antioxidantes.....	15
Tabla 1.4 Clasificación de los compuestos fenólicos	16
Tabla 2.1 Clasificación de las muestras de chocolates adquiridos	32
Tabla 2.2 Preparación de la gráfica de calibración de Folin-Ciocalteu	33
Tabla 2.3 Preparación de la gráfica de calibración CUPRAC	35
Tabla 2.4 Condiciones Cromatográficas para la determinación de (+)-catequina y (-)-epicatequina	36
Tabla 2.5 Concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina para la gráfica de calibración por HPLC	37
Tabla 3.1 Absorbancia de los estándares de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.....	43
Tabla 3.2 Concentración de TPC en muestras de chocolate por el método de Folin-Ciocalteu...	45
Tabla 3.3 Prueba de ANOVA para TPC en chocolates	46
Tabla 3.4 Prueba de Tukey para TPC en chocolates	47
Tabla 3.5 Absorbancia de los estándares de trolox por el método de CUPRAC	49
Tabla 3.6 Concentración de TAC en muestras de chocolate por el método CUPRAC	50
Tabla 3.7 Prueba de ANOVA para TAC en chocolates.....	52
Tabla 3.8 Prueba de Tukey para TAC en chocolates.....	52
Tabla 3.9 Registro de los datos evaluados para determinar la linealidad en el método de determinación de (+)-catequina en HPLC	56
Tabla 3.10 Registro de los datos evaluados para determinar la linealidad en el método de determinación de (-)-epicatequina en HPLC	57
Tabla 3.11 Resultados estadísticos para (+)-catequina.....	57

Tabla 3.12 Resultados estadísticos para (-)-epicatequina	58
Tabla 3.13 Áreas cromatográficas de (+)-catequina obtenidas en un mismo día a un solo nivel. 58	
Tabla 3.14 Áreas cromatográficas de (-)-epicatequina obtenidas en un mismo día a un solo nivel	59
Tabla 3.15 Resultados obtenidos para repetibilidad	59
Tabla 3.16 Áreas cromatográficas de (+)-catequina obtenidas en seis diferentes días a un solo nivel.....	60
Tabla 3.17 Áreas cromatográficas de (-)-epicatequina obtenidas en seis diferentes días a un solo nivel.....	60
Tabla 3.18 Resultados obtenidos para reproducibilidad	61
Tabla 3.19 Exactitud expresada en porcentaje de recuperación para (+)-catequina.....	61
Tabla 3.20 Exactitud expresada en porcentaje de recuperación para (-)-epicatequina.....	62
Tabla 3.21 Porcentaje de recuperación que se espera según la concentración del analito	62
Tabla 3.22 Resultados obtenidos para exactitud.....	63
Tabla 3.23 Contenido de (+)-catequina expresado en mg/g	64
Tabla 3.24 Contenido de (-)-epicatequina expresado en mg/g	64
Tabla 3.25 Sumatoria del contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina expresado en mg/g	65
Tabla 3.26 Prueba de ANOVA para el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina.....	65
Tabla 3.27 Prueba de Tukey para el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina	66
Tabla 3.28 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (S-W) en muestras de chocolate.....	68
Tabla 3.29 Correlación de Pearson entre TPC, TAC y C+ EC.....	70

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado de Análisis del reactivo de Folin-Ciocalteu	84
Anexo 2: Certificado de Análisis del reactivo Trolox	85
Anexo 3: Certificado de Análisis del reactivo Neocuproína	86
Anexo 4: Certificado de Análisis del estándar de (+)-catequina	87
Anexo 5: Certificado de Análisis del estándar de (-)-epicatequina	88
Anexo 6: Certificado de Análisis de la columna para HPLC	89



LISTA DE ABREVIATURAS

C.V.: Coeficiente de Variación Porcentual

C: (+)-catequina.

CUPRAC: Capacidad Antioxidante Reductora de Cobre.

CV_H: Coeficiente de Variación de Horwitz

EC:(-)-epicatequina.

FC: Folin-Ciocalteu

GA: Acido Gálico.

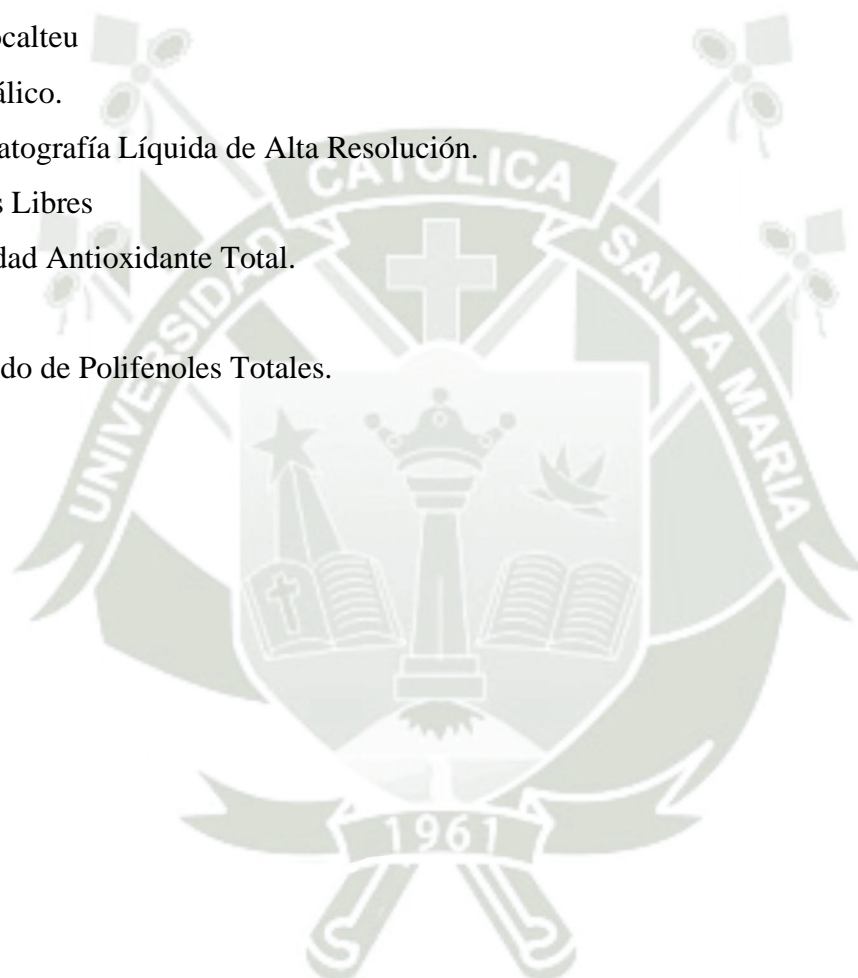
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

RL: Radicales Libres

TAC: Capacidad Antioxidante Total.

TE: Trolox.

TPC: Contenido de Polifenoles Totales.



INTRODUCCIÓN

El chocolate es considerado como uno de los alimentos más populares y consumido por personas de todas las edades, con un alto aporte energético y una fuente de compuestos fitoquímicos con potenciales efectos favorables a la salud. Este proviene de la semilla del árbol de cacao (*Theobroma cacao* L.), que es una especie originaria de los bosques tropicales húmedos de América del Sur, en el área del alto Amazonas, que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil (1).

En el Perú, se encuentra el 60 % de la biodiversidad de cacao existente en el mundo, y se producen las variedades de Trinitario 53.3 % (Junín), Forastero amazónico 37,3 % (Cusco y Ayacucho) y Criollo 9.4 % (zona norte de San Martín, Amazonas y Cajamarca) (2).

Para la formulación del chocolate se tienen ingredientes claves como el cacao, la manteca de cacao, el azúcar, los emulsionantes, el aroma y los componentes de la leche si son necesarios. La proporción de estos ingredientes definen diferentes categorías primarias de chocolate conocidas como negro, con leche, blanco y con diversos porcentajes; además, los granos de cacao contienen compuestos bioactivos, sobre todo polifenoles, incluyendo flavanoles ((+)-catequina y (-)-epicatequina, procianidinas), flavonoles (quercetina y sus glucósidos) y ácidos fenólicos (ácido gálico). También, los granos de cacao tienen cantidades significativas de alcaloides (principalmente teobromina y cafeína), péptidos de metilxantina y N-fenilpropenoil-L-aminoácidos (3).

Dentro de la composición de los chocolates están presentes los ácidos grasos saturados e insaturados (mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquídico). También presentan compuestos volátiles que le confieren su característico aroma y sabor los cuales, varían según el genotipo del cacao, las condiciones climáticas, el proceso de producción, fermentado, secado, tostado y conchado (4).

Dentro de los compuestos bioactivos que posee el cacao, se caracterizan los polifenoles y las metilxantinas. Los polifenoles presentan actividad antioxidante, por lo que juegan un papel importante en actividades dentro del cuerpo humano, ya que pueden mejorar aspectos de la función cognitiva a través de la actividad neuronal mejorada, mejora del rendimiento visual y el flujo sanguíneo cerebral; asimismo, reducen el riesgo de enfermedad coronaria (5–7). Las metilxantinas, son alcaloides farmacológicamente activos y tienen la capacidad fisiológica para modular el

sistema nervioso central, actúan como vasodilatadores y poseen propiedades tónicas y antineurálgicas (5,8).

El público en general consume preferentemente más chocolate que cacao. Cabe resaltar que en el mercado se puede encontrar un gran número de chocolates ya sean nacionales o importados. Actualmente el etiquetado de muchas tabletas indica el porcentaje de sólidos de cacao, dado que estos representan la fuente de polifenoles (flavanoles) en el chocolate, el número puede indicar el nivel de estos compuestos en el producto (9).

Diversos estudios como los realizados por Jaćimović S, et al. en el año 2022; Gu et al en el 2006; Mikołajczak y Tánska en el 2021, muestran que existe una buena correlación entre el contenido de compuestos bioactivos y el contenido de cacao declarado, lo que indica que el porcentaje de cacao declarado es un indicador fiable de la actividad antioxidante del chocolate (10–12).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la correlación entre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina) con el porcentaje de sólidos de cacao en chocolates comerciales.

HIPÓTESIS

“Dado que los sólidos de cacao presentes en los chocolates contienen diversos compuestos fitoquímicos con efectos beneficiosos para la salud tales como los compuestos fenólicos y que, además estos pueden variar en relación al porcentaje de cacao declarado en el producto final, es probable que exista una relación entre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina a medida que este porcentaje de sólidos de cacao declarado aumenta.”



OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la correlación entre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina con el porcentaje de sólidos de cacao en chocolates comerciales.

Objetivos Específicos

1. Determinar el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en las muestras comerciales de chocolate.
2. Determinar la capacidad antioxidante por el método de CUPRAC en las muestras comerciales de chocolate.
3. Cuantificar la concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en las muestras comerciales de chocolate, mediante un método estandarizado.
4. Evaluar la correlación entre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido (+)-Catequina y (-)-Epicatequina con el porcentaje de sólidos de cacao en chocolates comerciales mediante pruebas estadísticas.



**CAPÍTULO I:
MARCO TEÓRICO**

1. Chocolate

1.1. Cacao

El cacao, conocido por su nombre científico como *Theobroma cacao* L, es un árbol que puede alcanzar una altura entre 4 a 8 metros y si crece con buena sombra hasta 10 metros; sus frutos tienen una forma entre elipsoidal, ovoide, oblonga, esférica o fusiforme de acuerdo a la zona geográfica de donde provenga o su genética, conteniendo entre 30 a 40 semillas que son cubiertas por una pulpa dulce, blanca y comestible (1).

En el Perú, el cacao es una especie que se cultiva principalmente en la parte baja oriental de la vertiente de la Cordillera de los Andes entre los 200 y 900 m.s.n.m; siendo Cusco, el departamento que concentra la mayor producción de este (33.1 % del total), seguido por el departamento de Ayacucho con 22.3 %, Amazonas con 12.6 % y por último Junín con 9.9 %; dando como total entre estas cuatro zonas un 78% de concentración de la producción a nivel nacional (2).

1.2. Taxonomía del cacao

El nombre científico que recibe el cacao o también llamado cacaotero es el de *Theobroma cacao* L; en el que la palabra *Theobroma* significa “alimento de los dioses” y la palabra *cacao* deriva de la palabra “nahua” que significa “cacáhua” (13). En la Tabla 1.1 se presenta la clasificación taxonómica.

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica del cacao

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Filo	Spermatophyta
Subfilo	Angiospermae
Clase	Magnoliópsida

Subclase	Dilleniidae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae/Sterculiaceae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i>

Bhattacharjee, Ranjana. (2018) (14)

1.3. Procesamiento del grano de cacao para la obtención de nibs de cacao

1.3.1. Proceso de cosecha

Este proceso comprende desde la recolección del fruto maduro hasta el almacenamiento del mismo en sacos. El fruto maduro se identifica por la presencia de una coloración amarilla o roja pálida, este se extrae del árbol con ayuda de una tijera de podar; luego de haber quitado todas las vainas maduras, se juntan y se abren cada una delicadamente con ayuda de un machete y se retiran los granos de cacao con consistencia mucilaginosa dulce y blanca para ser almacenados (15).

1.3.2. Proceso de fermentación

Este proceso tiene una duración de 4 a 8 días aproximadamente y va a depender de la variedad de cacao y la zona climática. Se procede a desprender el mucílago de los granos de cacao y este a su vez genera diversas reacciones bioquímicas que generan un cambio de color en los granos (violeta a marrón) y que se desarrollen precursores del aroma y sabor (15).

1.3.3. Proceso de secado

La finalidad de este proceso es eliminar la humedad que está presente en los granos de cacao fermentados; para ello, se dejan secar al sol por un periodo de 7 a 8 días. Los indicadores de que los granos estén bien secos y sean de buena calidad es por su color marrón, baja astringencia, amargor y ausencia de sabores desagradables (15).

1.3.4. Descascarillado

En este proceso se elimina cuidadosamente la cubierta externa del grano de cacao; así como, todos aquellos materiales extraños como palillos, piedras, etc. Independientemente del fin que vaya a tener el grano de cacao en la industria, siempre se realiza este proceso primero, para así poder luego obtener pasta o licor de cacao (1,15).

Existen dos formas para llevar a cabo el descascarillado:

- **Primera opción:** Se realiza un tostado previo de todo el grano (incluida la cáscara) a temperatura baja; terminado este proceso, se procede al descascarillado (1,15).
- **Segunda opción:** Se realiza un tratamiento térmico, donde el grano es sometido a radiación infrarroja en un transportador vibratorio o lecho fluidizado; esto hace que el agua se acumule en la superficie de la cáscara del grano y se quiebre, desprendiendo así la cáscara. Una de las ventajas de este proceso es que la alta temperatura provoca una menor contaminación microbiológica (levaduras y hongos). Generalmente este proceso es utilizado en las grandes industrias que manejan volúmenes gigantescos de cacao, ya que resulta muy rentable (1,15).

1.3.5. Tostado

La finalidad de este proceso es de remover la humedad que presenta el grano de cacao; para ello, se trabaja en un rango de temperaturas que varía entre 90 a 170 °C por un periodo de tiempo entre 15 a 30 minutos. Aquí, se produce la degradación de los aminoácidos presentes en el cacao, la desnaturalización parcial de las proteínas, la destrucción casi total de los azúcares reductores, pérdida de ácidos volátiles y otras sustancias que aportan acidez y amargor. Las únicas sustancias que no sufren grandes cambios durante este proceso son las grasas, polifenoles y alcaloides; y es que, esto está relacionado con el tiempo, temperatura y pérdida de agua (1,15).

1.3.6. Molienda y prensado

Una vez realizados todos los procesos anteriormente descritos, se procede a moler los granos de cacao, esto puede llevarse a cabo con molinos de disco, de clavijas o martillos, de bolas o de piedra, con el fin de obtener el licor de cacao, que luego será prensado y es en esta etapa donde se separa la manteca de cacao hasta el porcentaje deseado. El residuo que queda al final

de este proceso se denomina “torta de cacao”, la cual se pulveriza y se obtiene el polvo de cacao, el cual se utiliza en la industria alimentaria (1,15).

1.4. Elaboración de chocolate

Los procesos de fabricación del chocolate consisten básicamente en cinco: mezclado, refinado, conchado, templado y moldeado, los cuales se detallan de forma breve en la Figura 1.1.

1.4.1. Mezclado

Para la elaboración del chocolate, el mezclado es una operación fundamental, ya que se realiza utilizando una combinación entre tiempo y temperatura, todo esto dentro de una mezcladora continua o también puede ser discontinua, todo esto para obtener una formulación de consistencia constante. En las grandes industrias que realizan una mezcla por lotes, se combinan el licor de cacao, manteca de cacao, azúcar, grasa láctea y leche en polvo durante 12 a 15 minutos a una temperatura que oscila entre 40 a 50°C (16).

1.4.2. Refinado

La importancia de este proceso radica en obtener una textura suave en el chocolate, característica fundamental en la confitería moderna. Aquí, el azúcar, el licor de cacao y los sólidos lácteos se refinan hasta que alcancen un tamaño de partícula por debajo de 30 μm ; ya que, el tamaño final de estas partículas influye de manera decisiva en las propiedades reológicas y sensoriales del chocolate. Se pueden utilizar refinadoras de dos o cinco cilindros, las cuales consisten en un conjunto de cilindros huecos verticales que atraen películas finas de chocolate que suben y luego son eliminados por una cuchilla, la cual ayuda al recubrimiento de la misma con lípidos que se activan y atrapan los compuestos aromáticos volátiles del chocolate. El chocolate con leche presenta un tamaño de partícula de hasta 65 μm y para el chocolate negro es menor a 35 μm dependiendo de su composición y requerimiento (16).

1.4.3. Conchado

Considerado como el punto u operación final para la elaboración de chocolate con leche o negro. Este proceso es vital, ya que este contribuye con el desarrollo de la viscosidad, textura y sabor final que tendrá nuestro chocolate; este se realiza agitando el chocolate a una temperatura mayor a 50°C durante un par de horas, en una primera etapa se reduce la humedad

junto con la eliminación de algunos compuestos volátiles indeseables como el ácido acético; además, este proceso favorece el desarrollo del sabor, siendo este parcialmente caramelizado y a su vez, ayuda a reducir la viscosidad y el tamaño de partícula (16).

El equipo que se utiliza en este proceso se denomina “concha”, que consiste en un tanque con tres palas mezcladoras entrelazadas entre sí, que van a proporcionar una acción doble: cizallamiento y mezcla. La temperatura y el tiempo con el que se trabaja varía de acuerdo al tipo de chocolate, siendo para chocolates con leche un aproximado de 10 a 16 horas con una temperatura de 49 a 52°C y para chocolates biter de 70 a 82°C (16).

1.4.4. Atemperado

Para este proceso, se considera como un factor importante la cristalización de la grasa contenida en la manteca de cacao, la cual presenta varias formas polimórficas en función de la composición de ácidos grasos y triglicéridos. La manteca tiene principalmente seis formas polimórficas (del I al VI), teniendo como principales a α , β y β' ; de las cuales, la forma V, polimorfo β , es la forma deseable en el chocolate, ya que le da una apariencia brillante al chocolate y es resistente a la floración. Si el chocolate es mal templado, se obtiene la forma IV β , la cual se transforma en la forma V de forma rápida pero este presente una repercusión en el color (16).

Un chocolate que no es templado es blando y no se desmolda con facilidad, es por ello que el templado es fundamental para que el chocolate tenga características adecuadas como calidad final, color, dureza, manipulación, acabado y vida útil. Este proceso comprende cuatro etapas clave: fusión completa (50°C), enfriamiento hasta punto de cristalización (32°C), cristalización (27°C) y conversación de cristales inestables (29 a 31°C). Esta secuencia se trabaja en función a una receta, tipo de equipo y finalidad (16).

1.4.5. Moldeado

Este proceso está fundamentado en la distribución del tamaño de las partículas en el chocolate, ya que consiste en un factor clave de la reología del chocolate, influenciando directamente en la percepción sensorial del mismo. Para la medición de la distribución del tamaño de partícula se utiliza la técnica de difracción láser o también llamada dispersión de luz láser de bajo

ángulo; el principio de esta técnica es que el tamaño de las partículas es proporcional al ángulo de difracción (16).

Los beneficios que se obtienen a partir de este proceso es la reducción en los modificadores de viscosidad y el control predictivo del proceso (16).

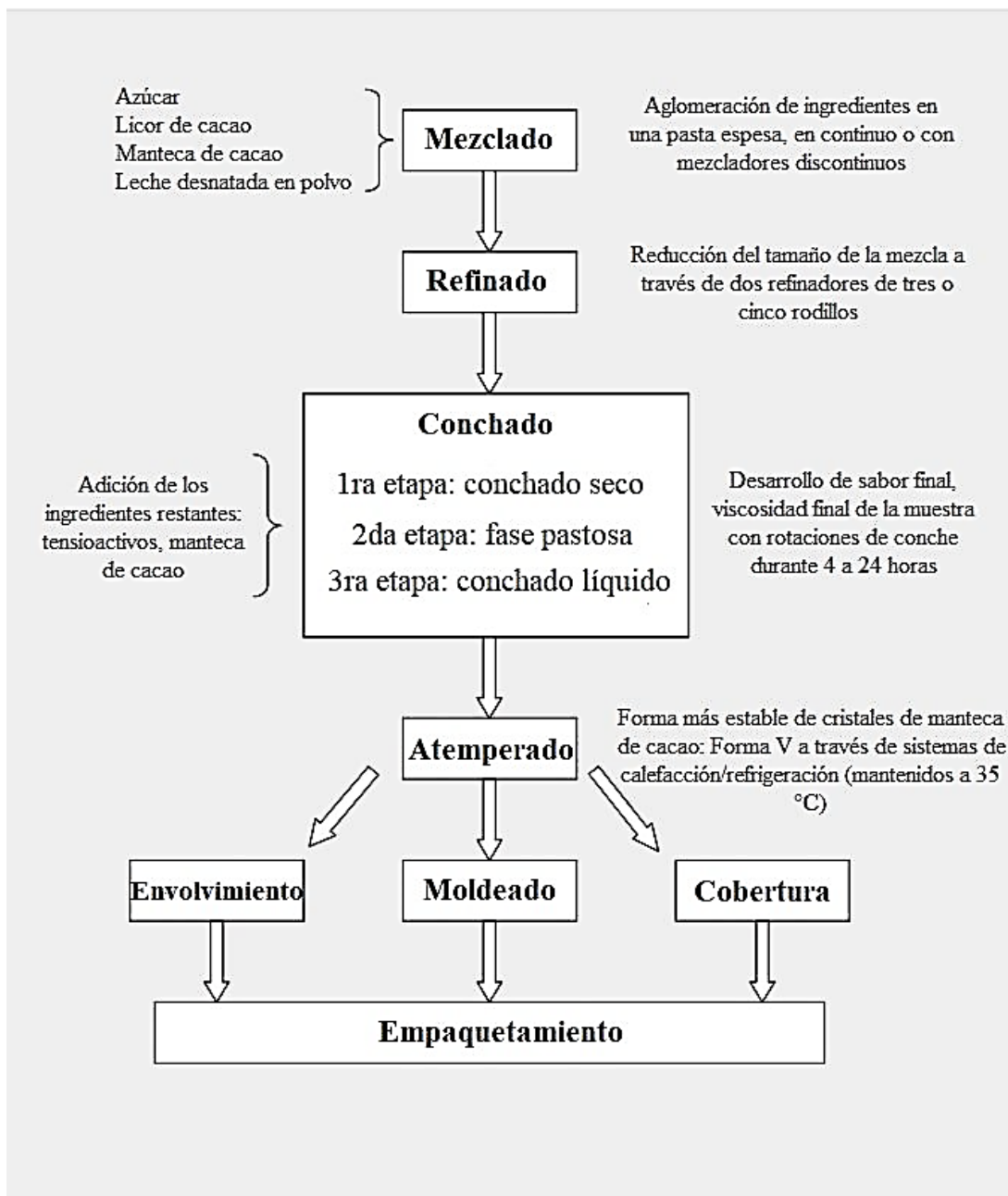


Figura 1.1. Flujograma del proceso de elaboración de chocolate

Afoakwa et al. (2010) (16)

1.5. Tipos de chocolate

Los diversos tipos de chocolate pueden ser agrupados de acuerdo al CODEX ALIMENTARIO (2016) por su composición y su forma, tal y como se muestra en la Tabla 1.2 de manera breve.

- **Chocolate:** Comprende a todos aquellos productos que contienen no menos del 35 % de extracto seco total de cacao, dentro del cual el 18 % corresponde por lo menos a manteca de cacao y 14 % a extracto seco magro. Aquí se incluyen chocolates de tipo amargo, semidulce, oscuro o fondant (17).
- **Chocolate dulce/familiar:** Chocolate que tiene no menos del 30 % en extracto seco total de cacao, donde 18 % corresponde a manteca de cacao y 12 % extracto seco magro (17).
- **Chocolate de cobertura:** Chocolate que contiene no menos del 35 % en extracto seco total de cacao, donde 31 % es manteca de cacao y 2.5 % extracto seco magro (17).
- **Chocolate con leche:** Chocolate que contiene no menos del 25 % en extracto seco de cacao y además, un mínimo entre 12 y 14 % en extracto seco de leche (17).
- **Chocolate familiar con leche:** Chocolate que contiene no menos del 20 % en extracto seco de cacao y no menos del 20 % en extracto seco de leche (17).
- **Chocolate de cobertura con leche:** Chocolate que contiene no menos del 25 % en extracto seco de cacao, no menos del 14 % de extracto seco de leche y además, no menos del 31 % en grasa (17).
- **Chocolate blanco:** Chocolate que contiene no menos del 20 % en manteca de cacao y no menos del 14 % de extracto seco de leche (17).
- **Chocolate gianduja:** Chocolate que se obtiene de la mezcla de dos componentes: el primero es un chocolate con no menos del 32 % en extracto seco de cacao y un mínimo de 8 % de extracto seco desgrasado; y el segundo es polvo fino de avellana entre 20 % a 40 % (17).
- **Chocolate gianduja con leche:** Chocolate que se obtiene de la mezcla de dos componentes: el primero es un chocolate con leche con no menos del 10 % de extracto seco de leche; y el segundo es polvo fino de avellana entre 15 % al 40 % (17).
- **Chocolate para mesa:** Chocolate no refinado con tamaño de grano de azúcar mayor a 70 micras y no menos de 20 % en extracto seco de cacao incluyendo un mínimo de 11 % de manteca de cacao y 9 % en extracto seco magro de cacao (17).

Tabla 1.2 Tipos de chocolate

Productos	Componentes (%)						
	Tipos de chocolate	Manteca de cacao	Extracto seco magro de cacao	Total de extracto seco de cacao	Materia grasa de la leche	Total de extracto seco magro de la leche	Almidón / harina
Por su composición							
Chocolate	≥18	≥14	≥35				
Chocolate a la taza	≥18	≥14	≥35			<8	
Chocolate dulce / familiar	≥18	≥12	≥30				
Chocolate familiar a la taza	≥18	≥12	≥30			<18	
Chocolate de cobertura	≥31	≥2.5	≥35				
Chocolate con leche		≥2.5	≥25	2.5-3.5	12-14		
Chocolate con leche familiar		≥2.5	≥20	≥5	≥20		
Chocolate de cobertura con leche		≥2.5	≥25	≥3.5	≥14		
Chocolate blanco	≥20			2.5-3.5	≥14		
Chocolate gianduja		≥8	≥32				≥20 ≤40
Chocolate gianduja con leche		≥2.5	≥25	2.5-3.5	≥10		≥15 ≤40
Chocolate para mesa	≥11	≥9	≥20				
Chocolate semiamargo para mesa	≥15	≥14	≥30				
Chocolate amargo para mesa	≥22	≥18	≥40				
Por su forma							
Chocolate en granos / copos / hojuelas	≥12	≥14	≥32				
Chocolate con leche en granos / Chocolate con leche en copos / hojuelas		≥2.5	≥20	≥3	≥12		
Chocolate relleno							
Bombones de chocolate							

CODEX ALIMENTARIO (2016) (17)

- **Chocolate para mesa semiamargo:** Chocolate que contiene no menos del 30 % en extracto seco de cacao, incluyendo no menos del 15 % de manteca de cacao y 14 % de extracto seco magro (17).
- **Chocolate para mesa amargo:** Chocolate que contiene no menos del 40 % en extracto seco de cacao, incluyendo no menos del 22 % de manteca de cacao y 18 % de extracto seco magro (17).
- **Chocolate en grano y chocolate en copos/hojuelas:** Ambos chocolates son productos que se obtienen a partir del cacao realizando una mezcla, extrusión y endurecimiento, lo que les da una consistencia y propiedades de friabilidad únicas. El chocolate en grano tiene forma cilíndrica corta y las hojuelas forma de escamas pequeñas planas (17).
- **Chocolate relleno:** Chocolate recubierto por uno o más chocolates de los anteriormente descritos (no menos del 25 % del peso total) a excepción de chocolate de taza, chocolate familiar de taza o chocolate para mesa; que contiene como núcleo otro componente diferente (17).
- **Bombones de chocolate:** Chocolate con tamaño de un bocado conteniendo no menos de 25% de chocolate con respecto al peso total del producto y con relleno de cualquier chocolate a excepción de chocolate para taza, chocolate familiar para taza o chocolate para mesa (17).

1.6. Propiedades y beneficios del chocolate

El chocolate es considerado como un alimento completo nutricionalmente hablando, contiene 61 % de carbohidratos, 30 % de materia grasa, 6 % de proteína y 3 % de humedad y minerales como fósforo, calcio y hierro; además de vitaminas como complejo B y A (18).

Debido a su composición se le atribuye el apelativo de “alimento altamente energético”, por lo que es un excelente suplemento nutricional, sobre todo para personas que realizan mucha actividad física y requieren una reserva energética adicional (18).

Así mismo, el cacao y sus derivados como el chocolate, tienen una gran cantidad de propiedades beneficiosas como reducir el riesgo de contraer una enfermedad cardiovascular; disminución de colesterol total y regulación de la presión arterial sistólica y diastólica; esto debido a su

contenido de polifenoles, que a su vez inactivan radicales superóxido, hidroxilo y radicales lipídicos e inhiben la peroxidación lipídica (19).

2. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que captan radicales libres actuando como donadores de electrones (agentes reductores), por lo que así previenen o retardan la oxidación de un sustrato oxidable. Estos compuestos comprenden un conjunto muy diverso y su función principal es contrarrestar de forma directa o indirecta los efectos perjudiciales que los radicales libres pueden producir, tales como la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El mecanismo por el cual estos actúan es cediendo un electrón al radical libre, logrando así oxidarse y transformarse en un radical libre débil, el cual tiene efectos tóxicos escasos o nulos. Estos compuestos químicos pueden producirse en las células o ser suministrados de forma externa a través de los alimentos o consumiendo suplementos (20).

2.1. Clasificación

Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos: endógenos (producidos por las propias células del cuerpo humano) y exógenos (adquiridos a través de la dieta o del consumo de suplementos con una formulación rica en antioxidantes. En la Tabla 1.3 se muestran los compuestos que están comprendidos dentro de esta clasificación (21).

Tabla 1.3 Clasificación de los antioxidantes

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido tióctico	Manganeso
	Enzimas	Hierro
Flavonoides	Superóxido dismutasa (SOD)	
	Catalasa	
	Glutación peroxidasa	
Lycopeno		Selenio

Criado Dabrowska y Moya Mir (2009)(21)

2.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son aquellos que poseen uno o más anillos aromáticos y estos a su vez uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos se consideran como los metabolitos

secundarios más abundantes dentro del reino vegetal con más de 8000 compuestos químicos conocidos, desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta sustancias complejas altamente polimerizadas como los taninos (22).

2.2.1. Característica

- Pueden tener estructura de tipo monomérica, dimérica o polimérica (23).
- La mayoría de compuestos derivan de los fenilpropanoides (23).
- Tienen un anillo de tipo aromático con un grupo -OH (23).
- La mayoría son de naturaleza ácida, solubles en agua, pudiendo formar puentes de hidrógeno (23).
- Son susceptibles a oxidarse, por lo que se les atribuye su propiedad como antioxidantes (23).
- Pueden presentar interacciones con grupos peptídicos como los taninos (23).
- Algunos fenoles presentan un grupo catecol, el cual puede formar quelatos con metales (23).
- El grupo más numeroso e importante corresponde a los flavonoides.

2.2.2. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se dividen en una gran variedad de moléculas que presentan en común una estructura polifenol, es decir varios grupos hidroxilo en un anillo aromático; así como también, moléculas con un grupo fenol en su anillo (ácidos fenólicos). Según su estructura química pueden ser de tipo no flavonoide (fenoles no carboxílicos y ácidos fenólicos) y flavonoides (antocianos; flavonas, flavononas y flavanoles; taninos condensados y lignanos (24). En la Figura 1.2 se observan las estructuras químicas de estos dos grandes grupos y en la Tabla 1.4 las diferentes clases de compuestos fenólicos que existen.

Tabla 1.4 Clasificación de los compuestos fenólicos

Estructura base	Clase	Ejemplos
C ₆	Fenoles simples Benzoquinonas	catecol, hidroquinona, resorcinol
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	ácido p-hidroxibenzoico y ácido salicílico
C ₆ -C ₂	Ácidos fenilacéticos	ácido p-hidroxifenilacético

	Ácidos cinámicos	ácido cafeico y ácido ferúlico
C ₆ -C ₃	Fenilpropenos	eugenol y miristicina
	Cumarinas	umbeliferona, esculetina y escopolina
	Cromonas	eugenina
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	juglona
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	mangostino y mangiferina
	Estilbenos	resveratrol
C ₆ -C ₂ -C ₆	Antraquinonas	emodina
Flavonoides		
	Flavonas	sinensetina, nobiletina, tangeretina, isosinensitina, varias flavonas polimetoxiladas
	Flavonoles	quercetina y canferol
	Glucósidos de flavonol	rutina
	Flavanonoles	dihidroquercetina y glucósidos de dihidrocanferol
	Flavanonas	hesperitina y naringenina
	Glucósidos de flavanona	hesperidina, neohesperidina, nariturina, naringina, eriocitrina, naringina
C ₆ -C ₃ -C ₆	Antocianinas	naringina, glicósidos de cianidina, incluidos los derivados acilados, glucósidos de pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina, malvidina, incluidas las formas aciladas, cianidina 3-glucósido y 3-rutinósido
	Flavanoles (catequinas)	(+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina
	Chalconas	derivados de la floretina, en particular la floridzina, arbutina, glucósido de floretina, calconaringenina
(C ₆ -C ₃) ₂	Ligninas	pinoresinol
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	agathis flavona

K. Robards et al (1999) (24)

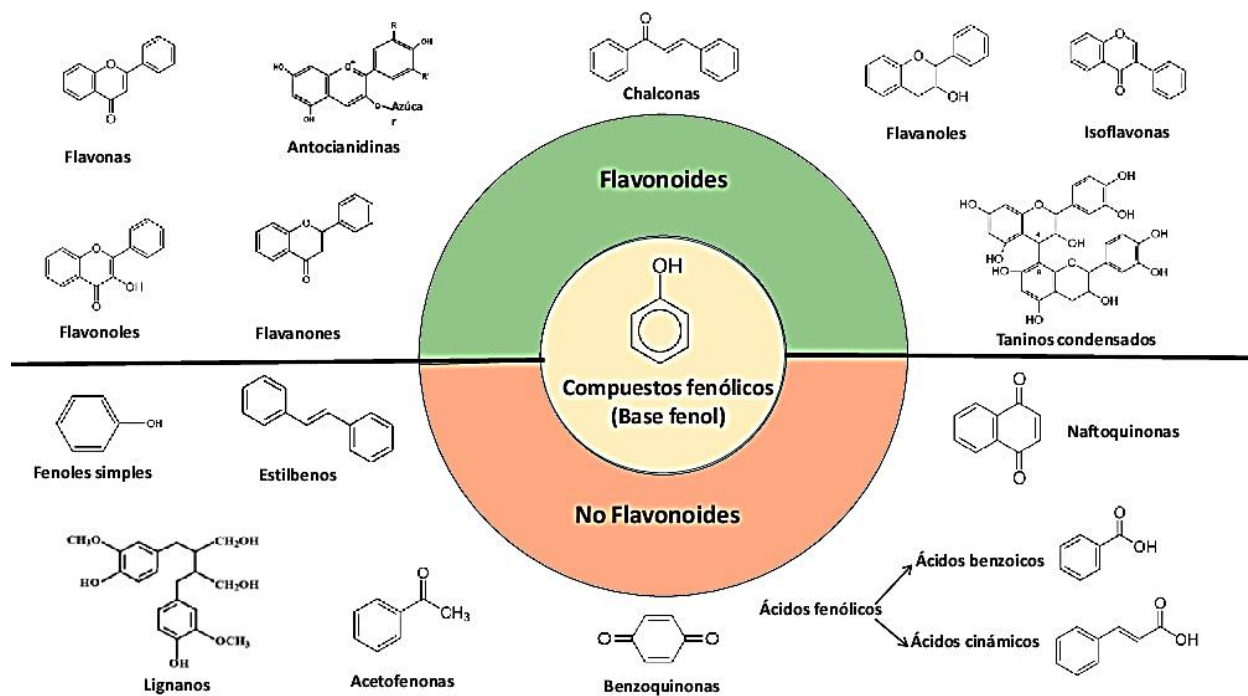


Figura 1.2 Estructuras químicas de los diferentes compuestos fenólicos

Perez-Perez et al. (2018) (25)

2.2.3. Flavanoles (Catequinas)

Los flavanoles, o también conocidos como flavan-3-oles o flavanes, son compuestos cuya estructura química tiene un anillo C sin saturación y un grupo hidroxilo que se encuentra en la posición 3 del heterocíclico 2-fenilbenzopirano, como se observa en la Figura 1.3. En este grupo podemos encontrar como mayor representante a las catequinas, seguido de los taninos condensados y por último a los leucoantocianinas (26).

Las catequinas se encuentran en forma de aglicona en la naturaleza y son el tipo más común de flavanol que se puede encontrar, su nombre deriva del nombre del árbol de cual se aisló por primera vez el catecol, que es el árbol de la mimosa (*Cassia catechu*) y en su estructura química, tienen al heterociclo 2-fenilbenzopirano como base y un grupo hidroxilo o galato en posición 3. Estos compuestos químicos pueden encontrarse en una amplia variedad de plantas alimenticias, sobre todo en el cacao, té, arándanos y vino; y poseen un efecto astringente que se percibe en la boca cuando se consumen productos derivados de estos, como el chocolate. El consumo de estos compuestos químicos en los alimentos ha demostrado producir una

inhibición de la trombosis arterial, reducción de colesterol total y LDLy actividad antiinflamatoria, todo como parte de su capacidad antioxidante (26).

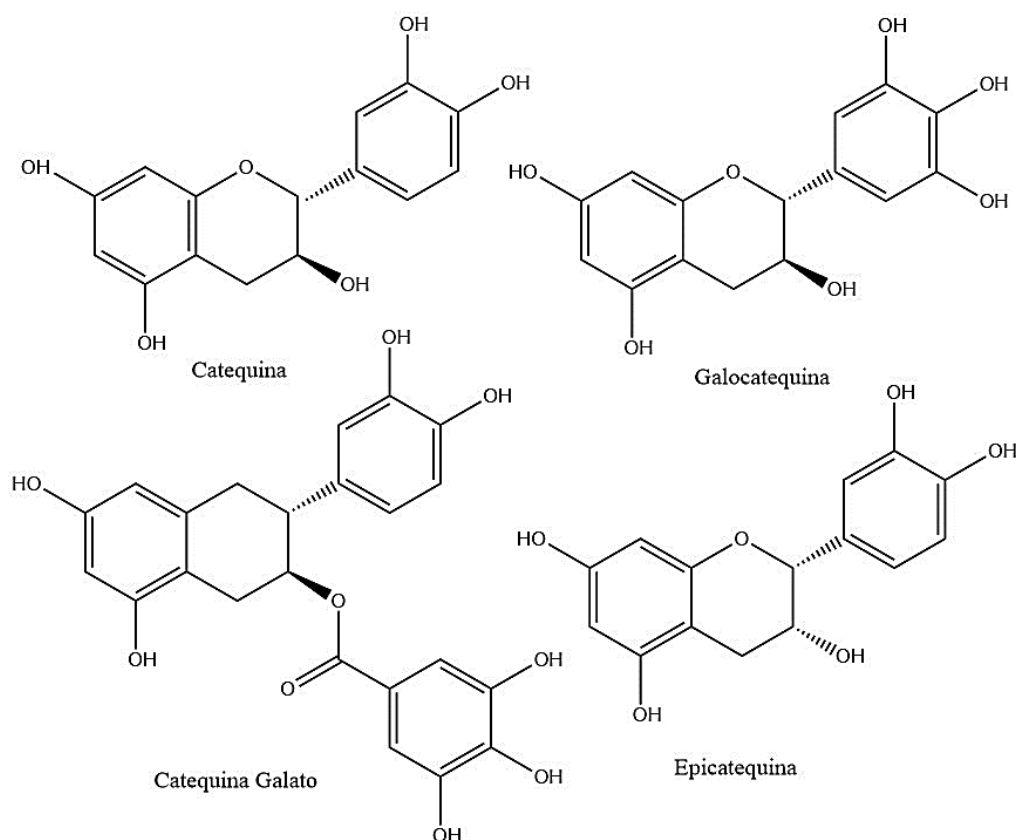


Figura 1.3 Estructuras químicas de los principales tipos de catequinas

Perez-Perez et al. (2018) (25)

2.2.4. Catequina y Epicatequina

La catequina (C) y epicatequina (EC) son flavanoles isoméricos que se diferencian por la configuración R y S que presentan en los dos carbonos asimétricos del anillo 2-fenil-3-cromanol, como se observa en la Figura 1.4. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándose en frutas como las uvas, manzanas y otros productos manufacturados como el vino, chocolate y té. El consumo de estos alimentos en el ser humano resulta beneficioso debido a las propiedades antioxidantes que presentan, retrasando el daño celular y combatiendo enfermedades crónicas de tipo cardiovascular y neurodegenerativas. Estas moléculas también poseen propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antivirales que se deben a sus numerosos grupos hidroxilo; los anillos aromáticos y sus OH asociados

permiten la construcción de varias interacciones que eliminan a los radicales hidroxilos e inhiben reacciones como la peroxidación lipídica y reacciones de oxidación (27).

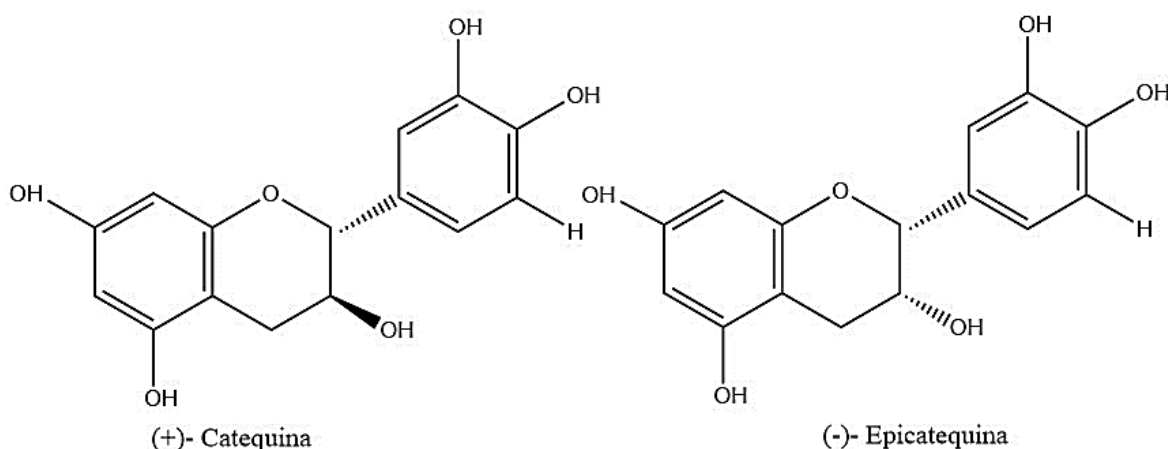


Figura 1.4 Estructuras químicas de catequina y epicatequina

Araújo Ramalho et al. (2014) (28)

2.2.5. Capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a que estos atrapan o inhiben la producción de radicales libres. Dentro de estos, destacan los flavonoides, ya que actúan como especie de tampón y atrapan los radicales libres generando un radical flavínico, el cual es menos reactivo debido a que los electrones desapareados que este presenta están más deslocalizados (29).

2.2.6. Mecanismo de acción de los compuestos fenólicos

Si bien los compuestos fenólicos presentan diversos mecanismos por los cuales actúan y brindan un efecto beneficioso al cuerpo humano, estos actúan principalmente como tampones, ya que capturan radicales libres generando así un radical denominado flavínico, que es mucho menos reactivo debido a que en él, los electrones desapareados están más deslocalizados (29). Como otros tipos de mecanismos por los cuales actúan los compuestos fenólicos, se sabe que estos son capaces de modular a la microbiota colónica o inhibir distintas enzimas (30). En la Figura 1.5 se observan otros mecanismos de acción que tienen los compuestos fenólicos.

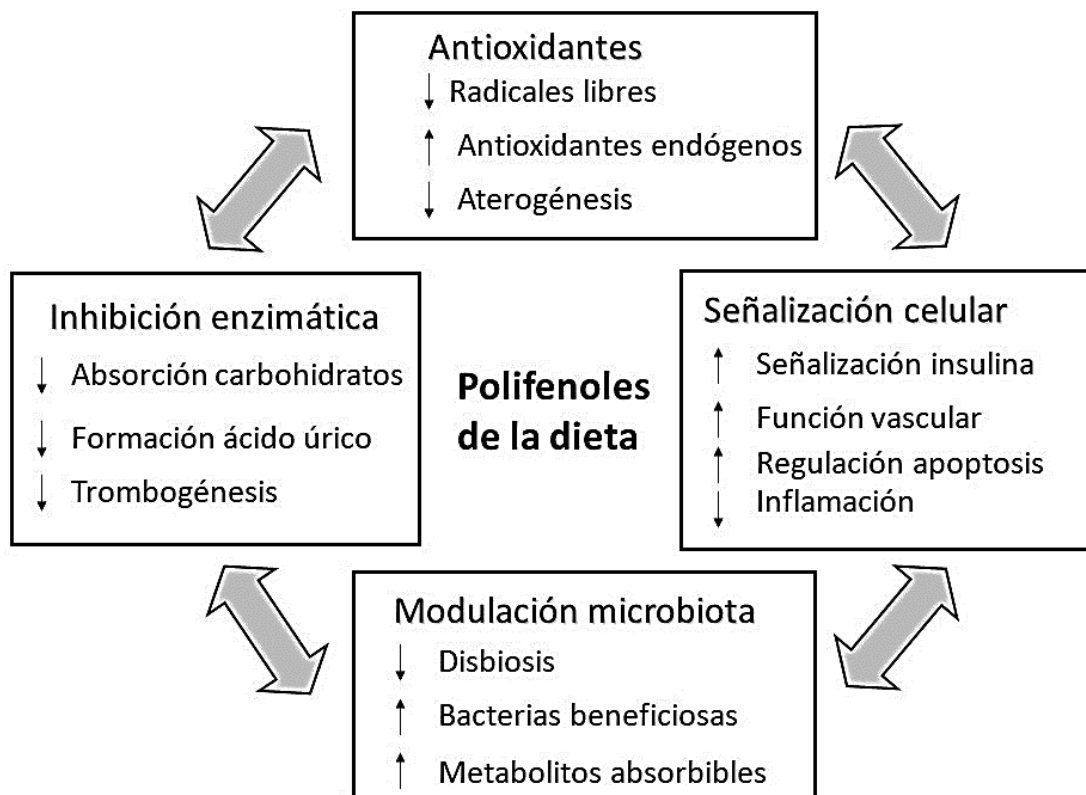


Figura 1.5 Principales mecanismos de acción de los compuestos fenólicos
Pérez Jiménez (2019) (30)

2.2.7. Determinación de la cantidad de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu es una prueba que se utiliza para medir el contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) que existen en una muestra. Este se basa en la reacción de estos compuestos con el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) a un pH básico, que da lugar a una coloración azul y que se determina por espectrofotometría a una longitud de onda de 765 nm (31).

El reactivo FC consiste en una mezcla de tungstato y molibdato sódico disueltos en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibdotúngstico, que es de color amarillo, se reduce por la presencia de grupos fenólicos y da lugar a un complejo coloreado de color azul intenso. Esta reacción es una reacción de tipo redox (Figura 1.6), por lo que puede considerarse como un método para la medición de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes

en las muestras se cuantifican espectrofotométría en base a una recta patrón de ácido gálico (31).

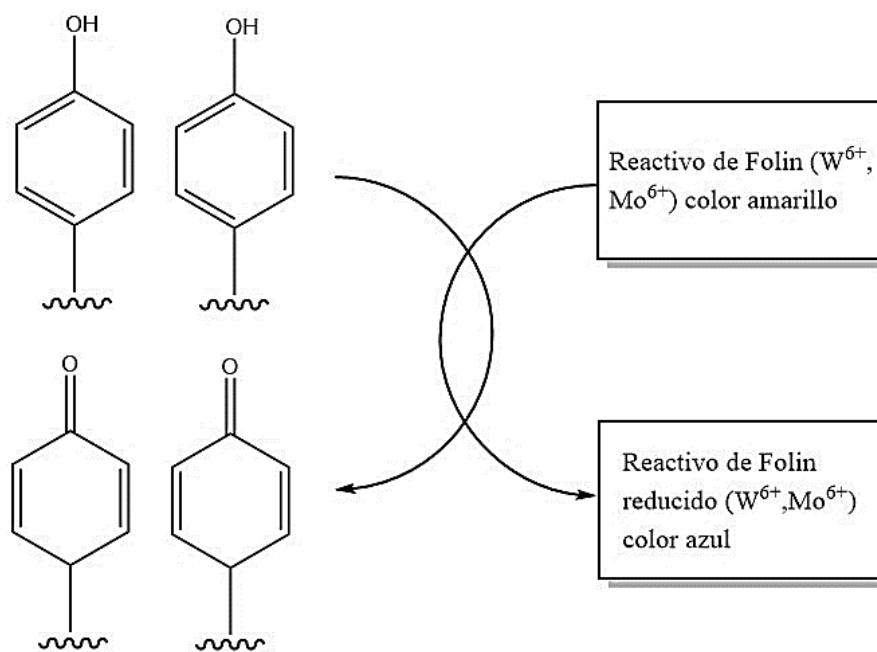


Figura 1.6 Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu

García Martínez et al. (2015) (31)

2.3. Radicales Libres

Los radicales libres (RL) son moléculas que contienen en su última órbita uno o más electrones desapareados y existen de forma independiente; estos electrones desapareados les otorgan un carácter paramagnético, lo que las vuelve inestables y altamente reactivas, por lo que tienen una capacidad inespecífica para combinarse con las diferentes moléculas que se encuentran en las estructuras celulares y sus derivados y atacan cualquier tipo de biomolécula. Por la configuración electrónica que poseen, tienen una vida media corta, sin embargo, diversos estudios demuestran que la reactividad de estas moléculas se correlaciona inversamente con su capacidad de difusión y vida media (32).

Estas moléculas se forman por diversos mecanismos, siendo el más común la adición de un electrón a una molécula estable; cuando se forman, estos buscan la forma de mantener una configuración electrónica estable por lo que interactúan con diversas moléculas por medio de reacciones de óxido reducción (REDOX), por lo que existe una transferencia de electrones

(ganancia y pérdida) y esto genera una producción de radicales libres en cadena, la cual solo se detiene si dos radicales libres se encuentran y reaccionan entre sí (32).

2.4. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es la condición en la cual la célula sufre un desbalance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes, el cual produce un daño a nivel general que afecta todos los procesos metabólicos de la célula y que, si se prolonga por mucho tiempo, puede provocar un daño de tipo irreparable e irreversible, pudiendo llegar hasta la muerte. Actualmente, se reconoce que el estrés oxidativo es el resultado de una disminución en los niveles de defensas antioxidantes que tiene la célula o bien, puede darse como consecuencia de un exceso de la producción de RL; en ambos casos, los procesos bioquímicos que se suelen llevar con normalidad en la célula, se ven afectados a nivel del ADN, siendo un daño de gran importancia que puede llevar a ocasionar una muerte celular programada o también conocida como apoptosis (33).

2.5. Determinación de la actividad antioxidante por el método de CUPRAC

Para determinar la capacidad antioxidante total (TAC) de un compuesto, existen diversos métodos a emplear, dentro de los cuales se encuentran aquellos que se basan en el potencial redox no radical, este se basa en que los antioxidantes (conocidos también como reductores), tiene una capacidad de donación de electrones que les permiten eliminar RL y a su vez, reducir elementos con un mayor estado de valencia; es por eso, que el poder reductor es un indicador importante y puede medirse mediante una reacción redox con varios iones metálicos, como por ejemplo el ensayo de CUPRAC (34).

El ensayo de la capacidad antioxidante reductora del ion cúprico (CUPRAC), es básicamente un ensayo que utiliza al cobre como oxidante, este método mide el poder reductor de la conversión del ion cúprico en cuproso (Figura 1.7), utilizando un ligando que forma un complejo cobre-ligando, el cual facilita la medición de absorbancia de este. El ligando que trabaja es la neocuproína, el cual es un cromóforo con una absorción a una longitud de onda de 450 nm (34).

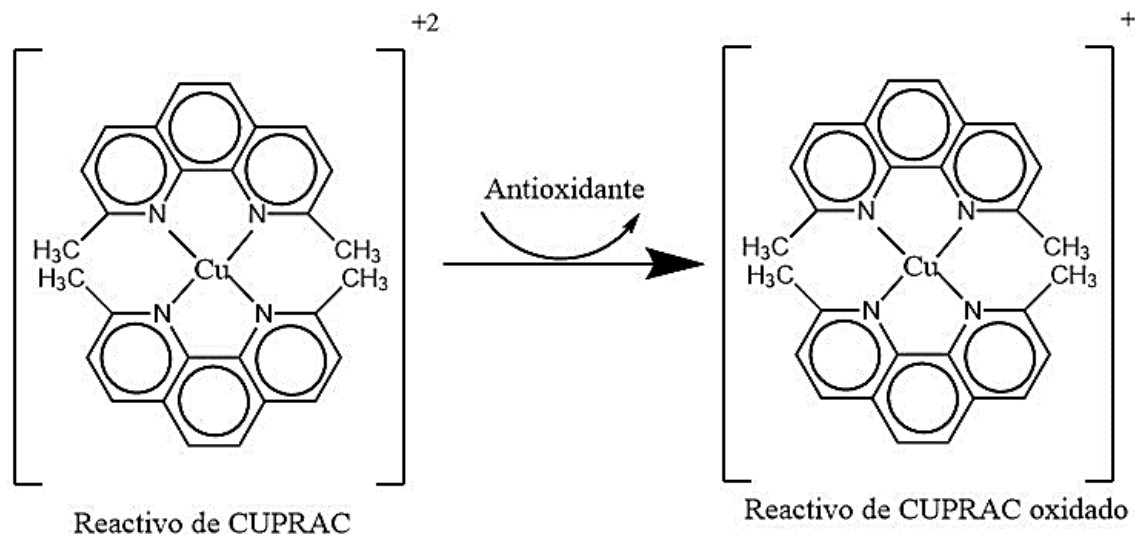


Figura 1.7 Mecanismo de acción del ensayo de CUPRAC

G-Biosciences (2014) (35)

3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

3.1. Definición

La cromatografía en general, es un método que se usa principalmente para separar los componentes que tiene una muestra, los cuales se van a distribuir en dos fases, una de ellas corresponde a la fase estacionaria y la otra a una fase que no se mueve. La fase estacionaria puede ser un gel, un líquido retenido sobre un sólido o un sólido; esta puede ser distribuida a manera de película o extendida como una capa. Por otro lado, la fase móvil puede ser gaseosa o líquida (36).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método de separación y análisis de componentes químicos, en el cual se tiene una fase móvil y una fase estacionaria, las cuales son inmiscibles entre sí. La fase móvil es líquida y lleva la muestra a través de la fase estacionaria, que es de tipo sólida o es una película líquida que es soportada en un sólido inerte (37).

3.2. Componentes básicos

Un equipo para HPLC consta de seis instrumentos como se observa en la Figura 1.8: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador.

- **Reservorio:** Aquí se encuentra la fase móvil, la cual es una mezcla entre sustancias de tipo polar y no polar, estas varían de concentración y proporción de acuerdo a lo que se busque analizar. Estas sustancias deben ser previamente filtradas a fin de evitar obstrucciones en el equipo. Los reservorios generalmente son de vidrio y se requieren de uno a más, dependiendo del tipo de muestra a analizar y si la elución es de tipo isocrática o en gradiente (37).
- **Bomba:** Su función es succionar la fase móvil que se encuentra en el reservorio y la hace fluir por el sistema a velocidad constante y precisa. Normalmente la bomba trabaja hasta una presión de 6000 psi, esto dependiendo de varios factores como el tiempo, la composición de la fase móvil, el flujo deseado y el tamaño de la columna. El volumen que se inyecta aproximadamente varía entre 5 μ L a 5 mL (37).
- **Inyector:** Este puede ser de tipo manual o automático. Los equipos con inyector de tipo automático permiten introducir la muestra a la fase móvil de manera precisa y exacta; es por ello, que los inyectores de tipo manual actualmente no son empleados con frecuencia (37).
- **Horno:** Aquí se encuentra la columna y este instrumento regula y mantiene la temperatura de la misma, ya que la temperatura influye en la retención y selectividad de esta. La columna puede ser fabricada en acero inoxidable con una longitud entre 50 a 300 mm y está rellena de lo que viene a ser la fase estacionaria y su tamaño de partícula varía entre 3 a 10 μ m. Las dimensiones y materiales pueden variar y determinan la eficiencia, velocidad, resolución y vida útil de la columna (37).
- **Detector:** Este instrumento capta los cambios en los efluentes de la columna y los convierte posteriormente en señales eléctricas que son recibidas por un registrador. Pueden clasificarse en dos tipos: selectivos (como detectores de fluorescencia que miden una propiedad química o física propia de los solutos que se encuentran presentes en la mezcla) y universales (miden una propiedad física que es propia del eluyente) (37).
- **Registrador:** Aquí se recolectan y procesan todas las señales que se reciben y se expresan en un cromatograma para poder ser interpretados a posterior (37).

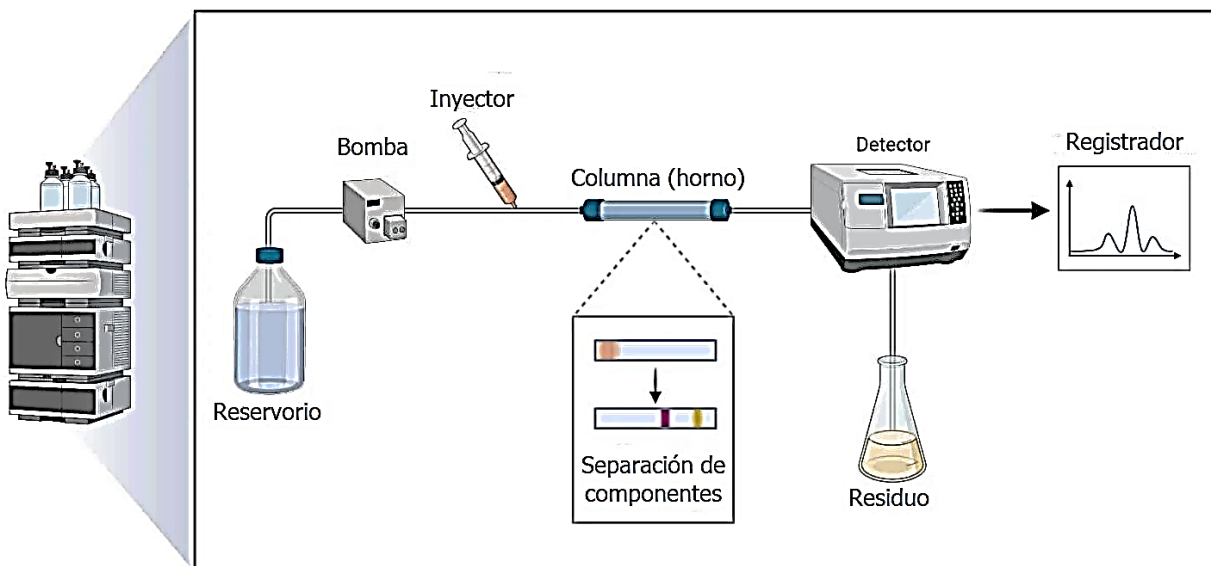


Figura 1.8 Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento

Sagar Aryal (2023) (38)

3.3. Tipos de cromatografía

- **Cromatografía de fase normal**

La cromatografía de fase normal (NP-HPLC) es uno de los modos más básicos de cromatografía. Consta de una fase móvil de naturaleza relativamente apolar y una columna con material de relleno relativamente polar (fase estacionaria). Las diversas polaridades que presentan las moléculas en una muestra van a determinar la velocidad de elución, las moléculas no polares eluirán más rápido en comparación a las de tipo polar (39).

- **Cromatografía de fase reversa**

La cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) refiere su principio a que es el inverso de la NP-HPLC, donde ahora la fase móvil será relativamente de naturaleza polar y la fase estacionaria será no polar; por lo que, los compuestos no polares serán retenidos más tiempo en la columna. Este tipo de cromatografía es más conocido y utilizado debido a su rendimiento alto, su capacidad para separar compuestos específicos, practicidad, eficiencia, reproducibilidad y asequibilidad. Este tipo de cromatografía utiliza solventes más polares como agua ultrapura, acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano (39).

- **Cromatografía de intercambio iónico**

La cromatografía de intercambio iónico (IE-HPLC) se fundamenta en la separación de moléculas de acuerdo a su carga iónica neta. Esta separación se produce por la competencia entre proteínas con diferente carga en la superficie, debido a grupos cargados de manera opuesta sobre una matriz o un adsorbente (40).

4. Validación de técnicas analíticas

Según la ISO 9000, una validación es una confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación en específico previsto (41).

En otras palabras, una validación busca demostrar que el método a utilizar por un laboratorio es adecuado para ser aplicado en lo que se propone a utilizar, así como, demostrar que las modificaciones que se plantean utilizar no afectarán el desempeño ni confiabilidad de los resultados (42).

4.1. Tipos de validación

- **Validación retrospectiva:** Se utiliza cuando un método es utilizado tradicionalmente pero no está normalizado y se utilizan los datos experimentales que el laboratorio dispone, recopilando la mayor cantidad de datos históricos disponibles (42).
- **Validación prospectiva:** Se utiliza cuando un método es nuevo y se obtiene información mediante el análisis de datos experimentales (42).
- **Validación menor o verificación:** Se utiliza cuando se trata de un método normalizado, método normalizado usado fuera del alcance propuesto, método normalizado con ampliaciones o modificaciones menores o métodos previamente validados (42).

4.2. Criterios de estandarización (normalización, validación menor o verificación)

4.2.1. Linealidad

La linealidad se puede definir como la capacidad que tiene un método analítico, dentro de un rango determinado, para dar una respuesta o resultado instrumental que sea proporcional a la cantidad de analito a determinar en una muestra problema (42).

4.2.2. Precisión

La precisión se puede establecer en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

- **Repetibilidad:** Es la precisión en condiciones donde los resultados se obtienen con un mismo método en ítems de análisis iguales en el mismo laboratorio, por el mismo analista y utilizando el mismo equipo, todo esto en intervalos de tiempo cortos (42).
- **Reproducibilidad:** Es la precisión en condiciones donde los resultados se obtienen con un mismo método en ítems de análisis iguales, pero en condiciones diferentes, ya sea diferentes analistas, diferente laboratorio, diferente equipo, etc (42).

4.2.3. Exactitud

La exactitud determina el grado de coincidencia que existe entre el valor medio que se obtiene en una serie de resultados y un valor de referencia. Este criterio puede ser determinado usando el valor de recuperación o el sesgo (42).

- **Recuperación:** Corresponde a la fracción de sustancia que se agrega a la muestra (muestra fortificada) antes de realizar el análisis. Este criterio permite ver el rendimiento que posee un método analítico en relación a un proceso de extracción y la cantidad de analito que está presente en la muestra original. Por lo que, la recuperación está muy relacionada con las características que tiene la matriz de la muestra (42)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad (LECC) de la Universidad Católica de Santa María, en el pabellón H-204/205.

MATERIALES

Equipos de laboratorio:

- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta resolución, modelo La Chrom Elite (Merck Hitachi).
 - Detector DAD (Diode Array Detector) (Merck Hitachi)
 - Bomba programable (Merck Hitachi)
 - Columna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) LiChroCART® 125-4 (Merck)
 - Software Chorm HPLC “System Manager”.
- Espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec (SHIMADZU)
- Potenciometro (Orion)
- Balanza analítica modelo Discovery, con sensibilidad de 0.1 mg (Ohaus)
- Purificador de agua (Purelab)
- Centrífuga (Benchmark)
- Bomba de filtración al vacío (Millipore)
- Ultrasonido (J.P. SELECTA)
- Vortex (Barnstead)

Materiales de laboratorio

- Tubos cónicos 15 mL
- Tubos tipo falcón fondo plano 50 mL
- Micropipeta de 100-1000 µL
- Propipeta
- Puntas para micropipeta 1000 µL
- Celda de cuarzo para espectrofotómetro
- Beakers 50 mL 100 mL

- Pipetas de 5 mL 10 mL
- Fiolas 10 mL 25 mL 50 mL 100 mL
- Probeta 500 mL
- Espátulas
- Embudo de filtración al vacío
- Viales ámbar para HPLC
- Filtro de membrana anotop 0.45 μ m
- Jeringas de 5 mL

Reactivos químicos

- Metanol grado HPLC (Merck)
- Éter (Merck)
- Ácido fórmico 98% (Merck)
- Trolox ≥ 98.0 % (Merck)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck)
- Carbonato de sodio anhidro p.a (Merck)
- Ácido gálico ≥ 98.0 % (Merck)
- Neocuproína ≥ 98.0 % (Sigma Aldrich)
- Cloruro Cúprico p.a
- Acetato de amonio p.a
- Estándar de (+)-catequina ≥ 98 % HPLC (Sigma Aldrich)
- Estándar de (-)-epicatequina ≥ 90 % HPLC (Sigma Aldrich)
- Agua Ultrapura

MÉTODOS

1. Obtención de la muestra

Para este estudio se seleccionaron 12 marcas de chocolate aleatoriamente con diferentes porcentajes de concentración de cacao declarado en la etiqueta; de cada marca se adquirieron 3 chocolates con diferente número de lote y se agruparon en cuatro grupos tal y como se observa

en la Tabla 2.1. El grupo A comprendía marcas de chocolate que tenían un porcentaje de cacao entre 30 % a 44 %; el grupo B entre 45 % a 59 %; el grupo C entre 60 % a 74 % y por último, el grupo D entre 75 % a 90 %.

Tabla 2.1 Clasificación de las muestras de chocolates adquiridos

Grupo	Codificación	Porcentaje de cacao (%)
A	TTB (101, 201, 301)	32
	IRP (101, 201, 301)	39
	MIP (101, 201, 301)	40
B	ADP (101, 201, 301)	50
	AAA (101, 201, 301)	50
	FIP (101, 201, 301)	52
C	PIP (101, 201, 301)	70
	BRP (101, 201, 301)	72
	HHB (101, 201, 301)	73
D	DEP (101, 201, 301)	85
	BBB (101, 201, 301)	85
	LLF (101, 201, 301)	85

2. Tratamiento de la muestra

Para el tratamiento de la muestra se usó el método de Chacón (2021), el cual consistió en pesar 1 g de chocolate en tubo Falcon de 15 mL, se mezcló con 5 mL de éter de petróleo agitándose vigorosamente durante 1 minuto en un vórtex. Seguidamente se procedió a centrifugar a 3000 rpm, durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el chocolate desgrasado, el cual reposo por 24 horas en un ambiente oscuro (43).

3. Obtención del extracto

Se obtuvo el extracto siguiendo el procedimiento de Díaz (2015). Se pesó 2 g de muestra desgrasada en un tubo al cual se agregó 10 mL de una solución metanol/agua (70 %). La mezcla se sometió a sonicación durante 30 minutos, el proceso se repitió dos veces, recogiendo el sobrenadante en ambos procesos. El extracto fue recogido en un tubo Falcon y sometido a centrifugación (3000 rpm) por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se llevó a una fiola de 25 mL y se completó el volumen con metanol/agua (70 %) (44).

4. Determinación del contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu)

El contenido total de polifenoles fue determinado mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito en la ISO 14502-1 (45).

4.1. Preparación de soluciones

- Solución de carbonato de sodio 7.5 % Na_2CO_3 : Se pesó 7.5 g de Na_2CO_3 previamente desecado y se llevó a volumen con agua ultrapura en una fiola de 100mL.
- Solución stock de ácido gálico (GA) 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$: Se pesó 0.1100 g de ácido gálico y se transfirió a una fiola de 100 mL se disolvió y se enrasó con agua ultrapura.
- Solución de Folin-Ciocalteu 10 %: Se transfirió 10 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu a una fiola de 100 mL y se enrasó con agua ultrapura.

4.2. Preparación de la gráfica de calibración

A partir de la solución stock de ácido gálico (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se prepararon 5 diluciones con concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se tomaron alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL respectivamente y fueron llevadas a fiolas de 100 mL y enrasadas con agua ultrapura. Con una pipeta se transfirió 1 mL de cada solución de ácido gálico a diferentes tubos y se agregó 5 mL de la solución de Folin-Ciocalteu 10 %. Después se agregó 4 mL de la solución de Carbonato de Sodio 7.5 %, como se muestra en la Tabla 2.2. Se cerraron los tubos y se agitaron, luego permanecieron en reposo por 60 minutos en un ambiente oscuro. Transcurrido ese tiempo se procedió a registrar la absorbancia en el espectrofotómetro a 765 nm, utilizando un blanco el cual tuvo los mismos componentes a excepción del ácido gálico.

Tabla 2.2 Preparación de la gráfica de calibración de Folin-Ciocalteu

Concentración de ácido gálico ($\mu\text{g}/\text{mL}$) *	Volumen de la solución de ácido gálico (mL)	Solución de Folin-Ciocalteu 10 % (mL)	Solución de Carbonato de Sodio 7.5 % (mL)
10	1	5	4
20	1	5	4
30	1	5	4
40	1	5	4
50	1	5	4

**Para obtener las concentraciones de ácido gálico de 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se usaron alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL a partir de la solución stock de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.*

4.3. Análisis de las muestras

Para determinar el contenido de polifenoles totales en las muestras de chocolate, se usó el extracto metanólico previamente obtenido. Se tomó 1 mL de extracto, se añadió 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (10%), después se agregó 4 mL de carbonato de sodio (7,5%). Se dejó reposar por 60 min en un ambiente oscuro. Se midió la absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro UV-visible.

5. Determinación de la capacidad antioxidante (CUPRAC)

Para la determinación de la capacidad antioxidante se usó el método de CUPRAC descrito por Poliński et al. (2022) (46).

5.1. Preparaciones de soluciones

- Solución de cloruro de cobre (CuCl_2) 10^{-2} M: Se pesó 0.17 g de CuCl_2 y se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 100 mL.
- Buffer acetato de Amonio (pH 7): Se pesó 7.70 g de acetato de amonio y se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 100 mL.
- Neocuproína 7.5×10^{-3} M: Se peso 0.15 g de neocuproína y se enrasó con etanol al 96° en una fiola de 100 mL.
- Solución stock de Trolox (TE) 1 mg/ml: Se pesó 25 mg de trolox y se enrasó en una fiola de 25 mL con metanol al 80 %.

5.2. Preparación de la gráfica de calibración

Se preparó una solución stock de Trolox 1 mg/ml y se realizaron 5 diluciones con las concentraciones de 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 600 ppm y 800 ppm las cuales fueron llevadas a fiolas de 10 mL y se enrasaron con metanol 80 %. Luego, en fiolas de 10 mL se agregó 0.6 mL de cada solución estándar respectivamente y posteriormente a cada fiola se agregó 2 mL de la solución de cloruro cúprico, seguidamente de 2 mL de neocuproína y por último 2 ml de buffer acetato de amonio, tal y como se muestra en la Tabla 2.3. Después las fiolas fueron enrasadas a 10 mL con agua ultrapura. Se dejaron reposar en un ambiente oscuro

por un periodo de 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se procedió a registrar la absorbancia en el espectrofotómetro a 450 nm, se usó un blanco el cual tuvo los mismos componentes excepto Trolox.

Tabla 2.3 Preparación de la gráfica de calibración CUPRAC

Concentración de Trolox (ppm) *	Volumen de la solución de trolox (mL)	Solución de $\text{CuCl}_2 10^{-2}$ M (mL)	Buffer acetato pH 7 (mL)	Neocuproína 7.5×10^{-3} M (mL)
100	0.6	2	2	2
200	0.6	2	2	2
300	0.6	2	2	2
600	0.6	2	2	2
800	0.6	2	2	2

**Para obtener las concentraciones de trolox de 100, 200, 300, 600 y 800 ppm se usaron alícuotas de 1, 2, 3, 5 y 8 mL a partir de la solución stock de 1 mg/mL respectivamente.*

5.3. Análisis de muestras

A los extractos metanólicos previamente obtenidos, se les determinó la actividad antioxidante; para ello se tomaron 0.6 mL de extracto, 2 mL de 0.01 mol CuCl_2 , 2 mL de solución de neocuproína (0.0075 mol/L) y 2 mL de tampón de acetato de amonio (pH = 7) se llevaron a fioles de 10 mL y se enrasaron con agua ultrapura. Se dejaron reposar por 30 minutos en un ambiente oscuro. Transcurrido el tiempo se registraron las absorbancias en el espectrofotómetro a 450 nm.

6. Determinación de catequina y epicatequina por HPLC

6.1. Cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de (+)-catequina y (-)-epicatequina

Se identificó el tiempo de retención de (+)-catequina y (-)-epicatequina usando estándares grado HPLC. De acuerdo a las condiciones cromatográficas descritas en el punto 6.2.

6.2. Condiciones Cromatográficas

Las condiciones cromatográficas fueron establecidas de acuerdo a lo descrito por Tokusoglu, Ö., Ünal, K.M. (2002), donde la fase móvil A correspondía a metanol grado HPLC (19.5 %) y la fase móvil B a buffer de ácido fórmico (80.5 %), usando un sistema de tipo isocrático con una velocidad de flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 20 µL, temperatura del horno a 40 °C y a una longitud de onda de 280 nm. El tiempo de cada corrida cromatográfica fue de 10 minutos (Tabla 2.4) (47).

Tabla 2.4 Condiciones Cromatográficas para la determinación de (+)-catequina y (-)-epicatequina

Fase móvil	Metanol (A) - Buffer ácido fórmico (B) (19.5:80.5)
Columna Cromatográfica	Columna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) LiChroCART® 125-4
Sistema	Isocrático
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda	280 nm
Temperatura	40 °C
Tiempo de análisis	10 minutos

6.3. Preparación de la fase móvil

Para la fase móvil A se utilizó metanol grado HPLC y para la fase móvil B se preparó midiendo 1.86 mL de ácido fórmico y se completó con agua ultrapura a un volumen total de 500 mL. Posteriormente se procedió a filtrar cada fase móvil con un filtro de 0.45 µm.

6.4. Preparación de la solución stock de (+)-catequina y (-)-epicatequina

Se preparó una solución stock de 500 ppm de ambos estándares, para ello se pesó 50 mg del estándar de (+)-catequina grado HPLC y 50 mg del estándar de (-)-epicatequina grado HPLC en una fiola de 100 mL y se enrasó con una solución metanol/agua en proporción de 1:1.

6.5. Estandarización del método analítico para la determinación de (+)-catequina y (-)-epicatequina por HPLC

6.5.1. Linealidad

A partir de una solución stock de 500 ppm previamente preparada se tomaron alícuotas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL y 6 mL y se llevaron a fioles de 10 mL, se enrasaron con una solución metanol/agua y se obtuvieron las concentraciones de 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm y 300 ppm de (+)-catequina y (-)-epicatequina (Tabla 2.5). Estas soluciones se filtraron con filtros anotop (0.45 μ m) para ser colocadas en viales de HPLC para su respectiva lectura cromatográfica. El proceso se realizó por triplicado (42).

Tabla 2.5 Concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina para la gráfica de calibración por HPLC

Concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina (ppm)	Solución de 500 ppm (ml)	Volumen total (mL)
50	1	10
100	2	10
150	3	10
200	4	10
300	6	10

Para evaluar la linealidad, se realizó un gráfico donde el eje (y) corresponde al área bajo la curva, en función del eje (x) que representa la concentración de los patrones (42).

De manera que este criterio sea aceptable, en primer lugar, se realiza un análisis visual para reconocer valores atípicos que no se encuentren en la línea central trazada. Seguidamente, se debe considerar el valor de R, el cual representa el coeficiente de correlación. Se espera que este valor sea lo más cercano a uno, ya que en este caso podrá asegurar la relación entre las variables, el área bajo la curva y las concentraciones (42).

Por último, para determinar si existe o no una correlación significativa se aplicó la prueba estadística T- Student, donde se calcularon el T_r , que representa el valor estimador de T- Student, y T crítico, que es el valor obtenido a partir de las tablas de T- Student de 2 colas, con un nivel de confianza del 95% y con n-2 grados de libertad (42). Se afirma si existe correlación significativa si:

$$Tr > T \text{ crítico}$$

Para determinar el valor de Tr se usó la siguiente fórmula:

$$Tr = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \text{ (Ec 2.1)}$$

Donde:

r= Coeficiente de correlación

r²= Coeficiente de determinación

n= número patrones utilizados

6.5.2. Precisión

6.5.2.1. Repetibilidad

Para este criterio se registraron 6 lecturas de los estándares de (+)-catequina y (-)-epicatequina que corresponden a una concentración de 150 ppm respectivamente, bajo las mismas condiciones las cuales fueron el mismo equipo, analista, laboratorio y en un corto intervalo de tiempo (42). Se calculó la desviación estándar (S) y el porcentaje de variación (C.V. %) con la siguiente fórmula:

$$C.V. = \frac{S}{x} \times 100 \text{ (Ec 2.2)}$$

A su vez, para comprobar que los valores sean óptimos, es necesario contrastarlos con la ecuación del coeficiente de variación de Horwitz (Ec. 2.3). El valor obtenido debe ser menor a la mitad del coeficiente de Horwitz para considerarlo correcto ($CV < (CV_H\%/2)$) (42).

$$C.V._H \% = 2^{(1-0.5)\log C} \text{ (Ec 2.3)}$$

La “C” representa la concentración del analito.

6.5.2.2. Reproducibilidad

Para este criterio se siguió el mismo procedimiento descrito en el punto 6.5.2.1, es decir bajo las mismas condiciones como el mismo tratamiento, equipo y analista, pero en días diferentes. (28) Aquí, el coeficiente de variación debe ser menor al doble del coeficiente de Horwitz dividido entre 3 para considerarlo correcto ($CV < (2CV_H\%/3)$) (42).

6.5.3. Exactitud

Para la determinación de este parámetro, se utilizó el método de recuperación de estándar, para lo cual se enriqueció una muestra de chocolate con una concentración de 150 ppm conteniendo ambos analitos (+)-catequina y (-)-epicatequina. Este proceso se realizó seis veces (42).

El valor de este parámetro se representa a través del porcentaje de recuperación, el cual se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\%R = \left(\frac{C_e - C_o}{C_a} \right) \times 100 \text{ (Ec 2.4)}$$

Donde:

%R= Porcentaje de recuperación.

C_e= Concentración de analito de la muestra enriquecida

C_o= Concentración de analito medida en la muestra sin adicionar

C_a= Concentración de analito adicionado a la muestra enriquecida

Finalmente, para determinar si existe una diferencia significativa se usó la prueba T-student. Para ello, es necesario calcular tanto el valor de T crítico como el valor de T calculado. El valor T crítico se obtiene utilizando las tablas de la distribución T-student con un nivel de confianza del 95%, una prueba de dos colas y n-1 grados de libertad (42). Por otro lado, el valor t calculado se refiere al valor obtenido a partir de la siguiente fórmula:

$$T_{calculado} = \frac{(100 - \%R)}{s \times \sqrt{n}} \text{ (Ec 2.5)}$$

Donde:

%R = Porcentaje de recuperación

S= Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación.

n= N° de lecturas registradas

6.6. Análisis de la muestra

Los extractos de chocolate previamente obtenidos, fueron filtrados con ayuda de una jeringa y filtros de 0.45 μm . Se colocaron en viales ámbar para HPLC y fueron llevados al equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, para su respectiva lectura. Cada lote fue analizado por triplicado.

7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los datos recopilados utilizando el software Microsoft Excel y el complemento XLSTAT. El programa de Excel brindó una plataforma versátil para la organización y el manejo de los datos obtenidos, mientras que el complemento XLSTAT proporcionó una amplia gama de herramientas y técnicas especializadas para el análisis estadístico. Se realizaron análisis descriptivos, regresión, pruebas de normalidad, correlación, ANOVA, entre otros. Los resultados obtenidos fueron interpretados y dieron respaldo a este trabajo de investigación.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención de la muestra

Se obtuvieron 12 marcas de chocolate con diferentes porcentajes de concentración de cacao declarado en la etiqueta tal como se muestra en la Figura 3.1 agrupadas en cuatro grupos. El grupo A comprendió marcas de chocolate que tenían un porcentaje de cacao entre 30 % a 44 %; el grupo B entre 45 % a 59 %; el grupo C entre 60 % a 74 % y por último, el grupo D entre 75 % a 90 %.

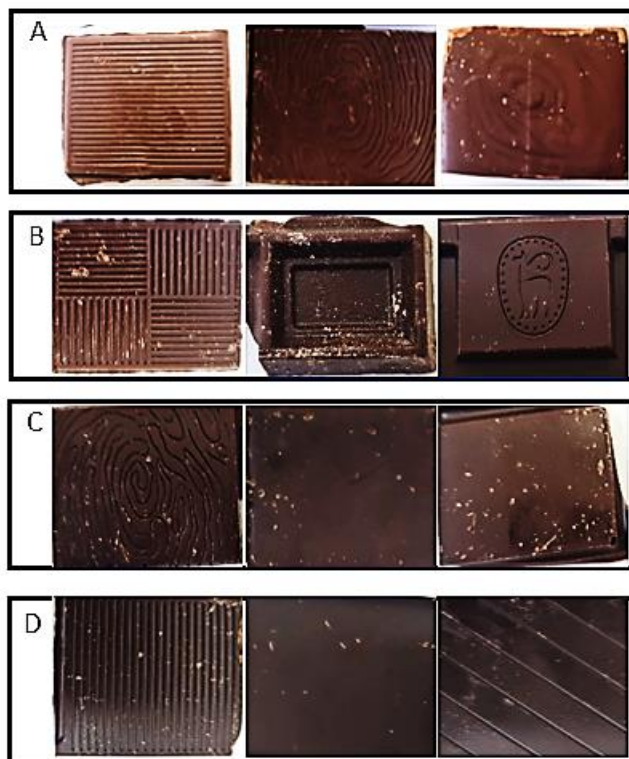


Figura 3.1 Muestras de chocolate. (A): Chocolates de entre 30 % - 44 %; (B) Chocolates de entre 45 % - 59 %; (C) Chocolates de entre 60 % - 74 % y (D) Chocolates de entre 75 % - 90 %.

2. Determinación del contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

2.1. Gráfica de calibración

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2 del capítulo II de materiales y métodos, se obtuvo la gráfica de calibración, cuyas concentraciones y absorbancias se presentan en la Tabla 3.1; se tomaron en cuenta 5 niveles que correspondían a las concentraciones de 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm y 50 ppm y se realizaron 3 repeticiones por cada nivel.

En la Figura 3.2 se observa la escala de colores que se obtuvo de la preparación de los diferentes niveles de la curva de calibración siguiendo el método de Folin-Ciocalteu antes de ser leídos en el espectrofotómetro, el último tubo corresponde al blanco.



Figura 3.2 Estándares de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu

Tabla 3.1 Absorbancia de los estándares de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu

Concentración (ppm)	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V.
	Rep 1.	Rep 2.	Rep 3.			
10	0.106	0.110	0.105	0.107	0.003	2,47
20	0.216	0.212	0.220	0.216	0.004	1,85
30	0.308	0.305	0.313	0.309	0.004	1,31
40	0.441	0.438	0.449	0.443	0.006	1,28
50	0.580	0.579	0.584	0.581	0.003	0,45

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

A partir de los valores de concentración de 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm y 50 ppm y sus respectivas absorbancias, se realizó la gráfica de calibración tal y como se observa en la Figura 3.3, donde se obtuvo un valor de R^2 de 0.9936.

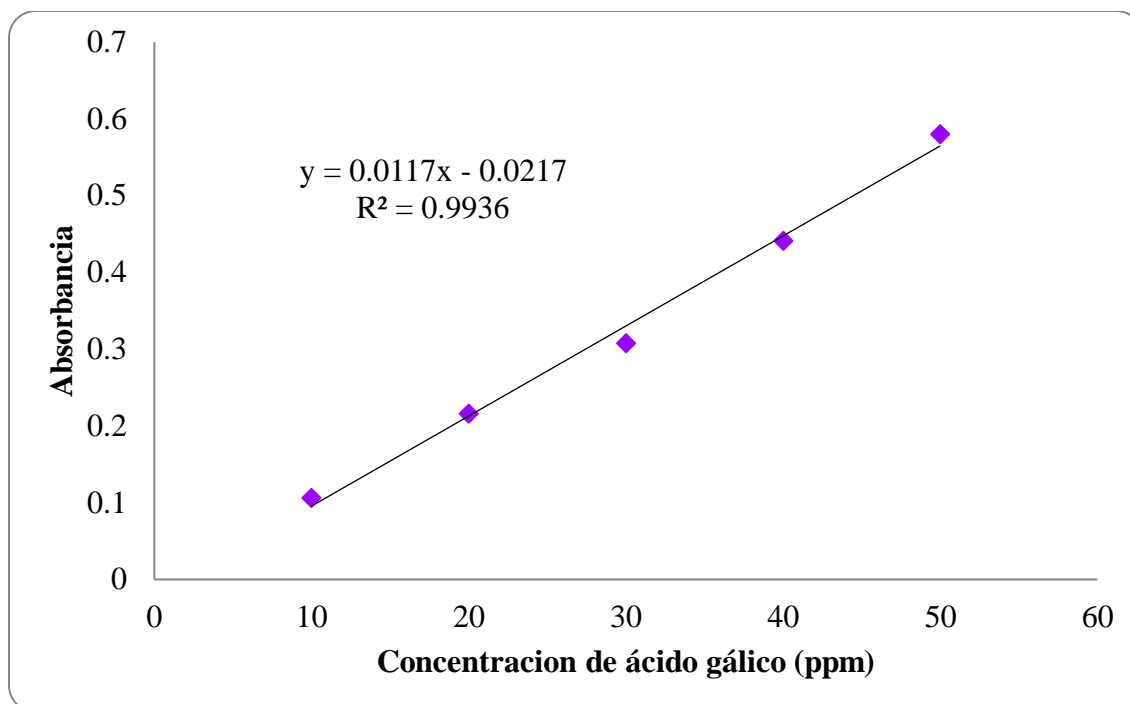


Figura 3.3 Gráfica de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu ($k = 3$)

k = número de repeticiones

Una vez obtenida la gráfica de calibración, se procedió a analizar las muestras de chocolate de las diferentes marcas obtenidas.

2.2. Cuantificación de fenoles totales en chocolates

Los extractos de cada muestra fueron tratados tal y como se describen en el apartado 4.3 del capítulo II de materiales y métodos; de este modo, se obtuvieron el registro de las absorbancias y se interpolaron a una concentración de ácido gálico utilizando la ecuación de regresión lineal mostrada en la Figura 3.4. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 3.2, aquí se observa que el grupo A presentó una concentración entre 21.933 mg GA/g a 32.596 mg GA/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 30 % a 44 % ; para el grupo B una concentración entre 68.757 mg GA/g a 95.729 mg GA/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 45 % a 59 %; para el grupo C una concentración entre 104.085 mg GA/g a 143.506 mg GA/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 60 % a 74 % y por último para el grupo D una concentración entre 90.633 mg GA/g a 143.773 mg GA/g, para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 75 % a 90 %.

Tabla 3.2 Concentración de TPC en muestras de chocolate por el método de Folin-Ciocalteu

Grupo	Muestras	Concentración (mg GA/g)			Promedio	St. Dev.	C.V.
		Lote 1	Lote 2	Lote 3			
A (30 % - 44 %)	TTB	20.928	23.195	21.675	21.933	1.155	0.05
	IRP	27.543	31.265	27.131	28.646	2.277	0.08
	MIP	31.063	33.239	33.487	32.596	1.334	0.04
B (45 % - 59 %)	ADP	62.298	66.999	76.973	68.757	7.494	0.11
	AAA	81.611	92.078	56.690	76.793	18.179	0.24
	FIP	104.812	80.709	101.665	95.729	13.102	0.14
C (60 % - 74 %)	PIP	146.990	128.588	139.312	138.297	9.243	0.07
	BRP	146.309	149.245	134.965	143.506	7.541	0.05
	HHB	114.387	101.710	96.157	104.085	9.344	0.09
D (75 % - 90 %)	DEP	87.353	88.619	95.927	90.633	4.628	0.05
	BBB	133.673	133.519	127.719	131.637	3.394	0.03
	LLF	140.994	141.449	148.876	143.773	4.425	0.03

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual

Como se observa en los resultados obtenidos anteriormente, se identificó una ligera tendencia con respecto al TPC a medida que se incrementa el porcentaje de sólidos de cacao declarado en las muestras como se observa en la Figura 3.4.

Para corroborar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes rangos de porcentajes de sólidos de cacao, se realizó una prueba de ANOVA. Los resultados de esta prueba se observan en la Tabla 3.3.

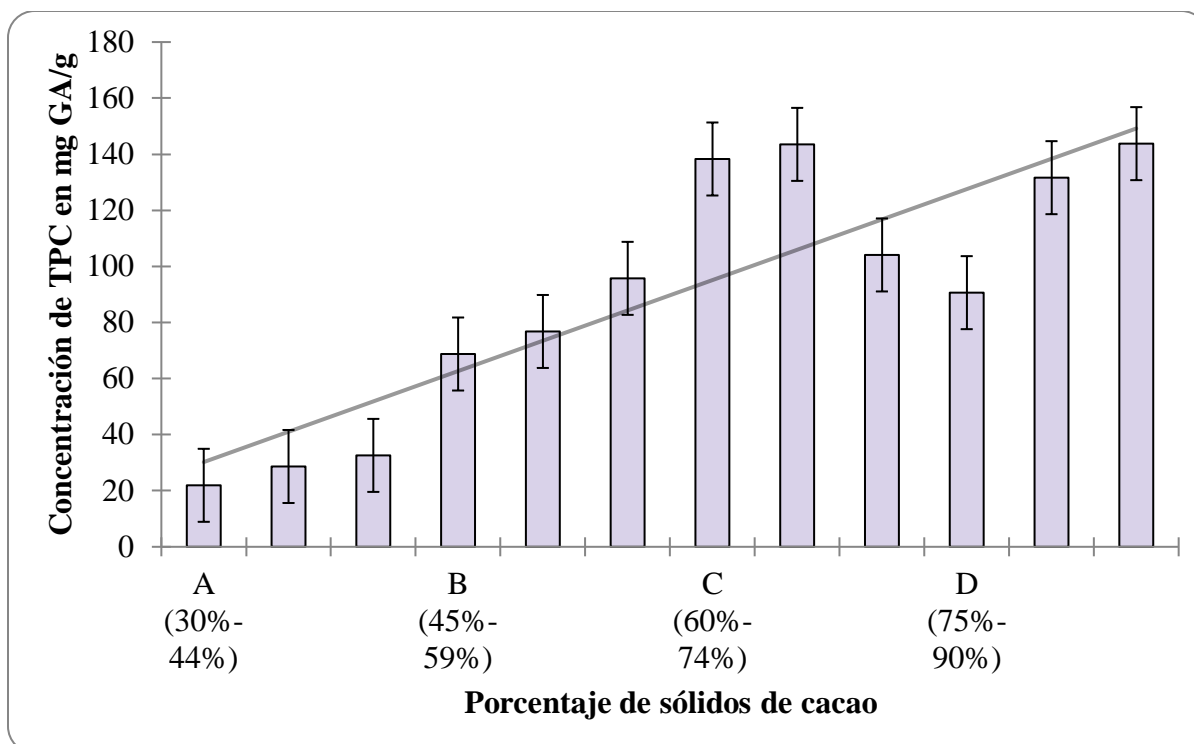


Figura 3.4 Concentración de TPC en mg GA/g en las muestras

Tabla 3.3 Prueba de ANOVA para TPC en chocolates

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedios de los cuadrados	F	p-valor
Regresión	3	19460.070	6486.690	17.834	0.00066681
Residuos	8	2909.782	363.723		
Total	11	22369.851			

Los resultados de la prueba de ANOVA con un nivel de confianza del 95 %, generaron un p-valor de 0.0006681 y un cociente F de 17.834. Ya que el p-valor es menor a 0.05 ($p < 0.05$), indica que existe diferencia significativa entre las concentraciones de TPC de los diferentes grupos de muestras. Para determinar las diferencias específicas entre los grupos, se llevó a cabo la prueba de Tukey. (Tabla 3.4)

Tabla 3.4 Prueba de Tukey para TPC en chocolates

Categoría	Media	Grupos homogéneos
C (60 % - 74 %)	128.629	X
D (75 % - 90 %)	122.015	X
B (45 % - 59 %)	80.426	X
A (30 % - 44 %)	27.725	X

Se identificó que no todos los grupos son homogéneos según la alineación de las X's, ya que cualquier par de intervalos que no se traslapen de manera vertical, corresponden a pares de medias que tienen una diferencia significativa al 95 % de confianza. Se observa que las categorías B (45 % - 59 %), C (60 % - 74 %) y D (75 % - 90 %) se traslapan verticalmente, por lo que indican una igualdad de medias; a diferencia de la categoría A (30 % - 44 %), que es la única que no se traslapa, por lo que existe una diferencia de medias con respecto a las otras categorías y sería estadísticamente diferente.

Según los datos de la bibliografía, el contenido total de polifenoles puede variar dependiendo del método de extracción de polifenoles y el tipo de solvente utilizado (10). Según L.M. Cheung et al. (2003) se sabe que, al incrementar la polaridad del disolvente de extracción, es posible obtener mayor rendimiento en la obtención de compuestos fenólicos (48). Además, que A.H. Azizah et al. (1999) investigaron siete sistemas de solvente y concluyeron que el metanol fue el mejor solvente para extraer compuestos fenólicos del cacao. Por lo tanto, el solvente de extracción de los compuestos bioactivos fue el metanol (49).

El TPC de los extractos de chocolate osciló entre 21.93 mg GA/g a 143.77 mg GA/g; estos resultados muestran que a medida que se va incrementando el porcentaje de cacao también incrementa el contenido de polifenoles.

En un estudio realizado por Calixto et al. (2019) usaron metanol al 80 % y 50 % como solventes de extracción y obtuvieron 5.39 mg GA/g para un chocolate con un contenido de sólidos de cacao de 50 % y 4.57 mg GA/g para uno de 72 % (50); asimismo, en la investigación realizada por Jaçimoviç et al. (2022) usaron una mezcla de acetona-agua-ácido clorhídrico (80:19,5:0,5 %, v/v/v) como agente de extracción y obtuvieron 15.30 mg GA/g de TPC para un chocolate con un contenido de sólidos de cacao de 73 %, y 36.09 mg GA/g para uno de 88

% (10). Estos resultados son inferiores a los obtenidos en este estudio sin embargo, es importante resaltar que el TPC puede cambiar según la variedad de grano de cacao, las condiciones durante la fermentación, secado, tostado, procesamiento y almacenamiento (51). También, en algunos casos, los resultados no pueden ser comparados directamente debido a las diferencias en los solventes usados en la extracción (52).

3. Determinación de la capacidad antioxidante (CUPRAC)

3.1. Gráfica de calibración

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2 del capítulo II de materiales y métodos, se obtuvo la gráfica de calibración, cuyas concentraciones y absorbancias se presentan en la Tabla 3.5; se tomaron en cuenta 5 niveles que correspondían a las concentraciones de 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 600 ppm y 800 ppm y se realizaron 3 repeticiones (k) por cada nivel. En la Figura 3.5 se observa la escala de colores que se obtuvo de la preparación de los diferentes niveles de la curva de calibración siguiendo el método de CUPRAC antes de ser leídos en el espectrofotómetro, el último tubo corresponde al blanco.



Figura 3.5 Estándares de trolox por el método de CUPRAC

Tabla 3.5 Absorbancia de los estándares de trolox por el método de CUPRAC

Concentración (ppm)	Absorbancia			Promedio	St. Dev.	C.V.
	Rep 1.	Rep 2.	Rep 3.			
100	0.231	0.221	0.225	0.226	0.005	2.23
200	0.406	0.404	0.412	0.407	0.004	1.02
300	0.978	0.972	0.985	0.978	0.007	0.66
600	1.488	1.486	1.495	1.490	0.005	0.32
800	1.961	1.956	1.950	1.956	0.006	0.28

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

A partir de los valores de concentración de 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 600 ppm y 800 ppm y sus respectivas absorbancias, se realizó la gráfica de calibración tal y como se observa en la Figura 3.6, donde se obtuvo un valor de R^2 de 0.9983

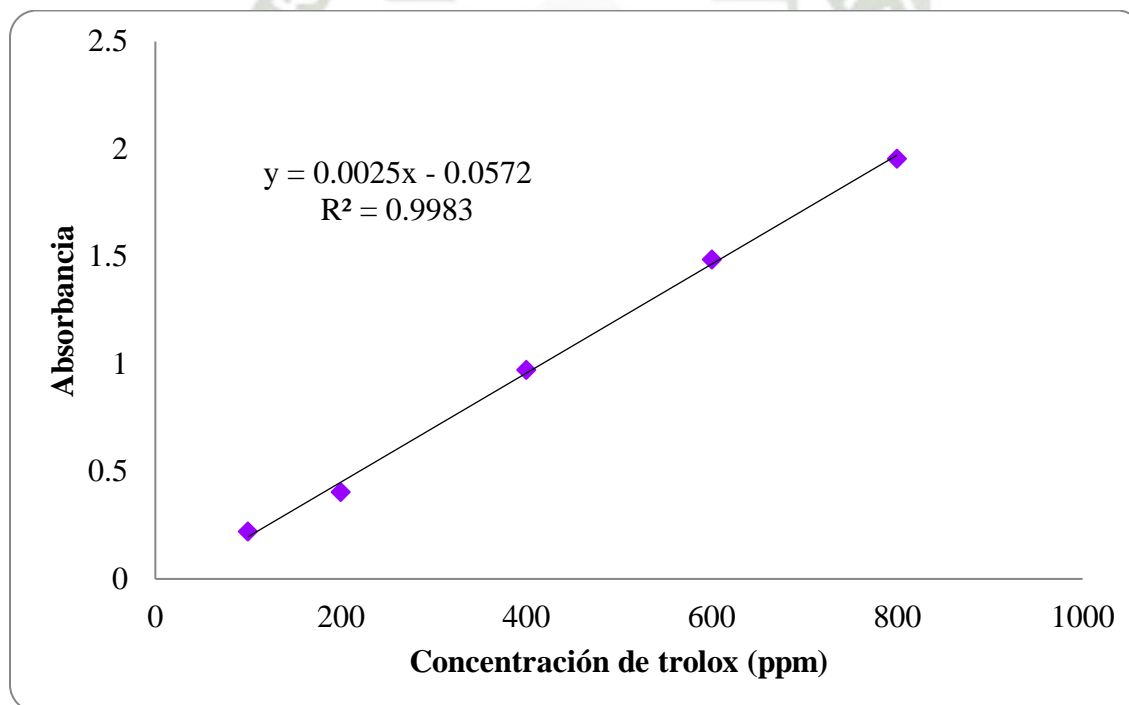


Figura 3.6 Gráfica de calibración de trolox por el método CUPRAC ($k = 3$)

k: número de repeticiones

Una vez obtenida la gráfica de calibración, se procedió a analizar las muestras de chocolate de las diferentes marcas obtenidas.

3.2. Cuantificación de capacidad antioxidante en chocolates

Los extractos de cada muestra fueron tratados tal y como se describen en el apartado 5.3. del capítulo II de materiales y métodos; de este modo, se obtuvieron lecturas de absorbancia y se interpolaron a una concentración de Trolox utilizando la ecuación de regresión lineal mostrada en la Figura 3.6.

Tabla 3.6 Concentración de TAC en muestras de chocolate por el método CUPRAC

Grupo	Muestras	Concentración (mg TE/g)			Promedio	St. Dev.	C.V.
		Lote 1	Lote 2	Lote 3			
A (30 % - 44 %)	TTB	113.629	130.605	119.103	121.112	8.665	0.07
	IRP	162.346	180.044	172.017	171.469	8.862	0.05
	MIP	195.485	192.598	196.400	194.828	1.984	0.01
B (45 % - 59 %)	ADP	324.294	320.632	329.765	324.897	4.596	0.01
	AAA	341.310	477.811	336.080	385.067	80.361	0.21
	FIP	582.857	517.341	663.183	587.794	73.046	0.12
C (60 % - 74 %)	PIP	1068.308	832.954	899.824	933.695	121.278	0.13
	BRP	1038.846	1048.357	952.784	1013.329	52.649	0.05
	HHB	570.937	626.633	612.876	603.482	29.012	0.05
D (75 % - 90 %)	DEP	562.770	547.687	615.056	575.171	35.355	0.06
	BBB	897.424	875.877	840.166	871.156	28.920	0.03
	LLF	913.424	1018.163	958.213	963.267	52.552	0.05

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 3.6, aquí se observa que el grupo A presentó una concentración entre 121.112 mg TE/g a 194.828 mg TE/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 30 % a 44 % ; para el grupo B una concentración entre 324.897 mg

TE/g a 587.794 mg TE/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 45 % a 59 %; para el grupo C una concentración entre 603.482 mg TE/g a 1013.329 mg TE/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 60 % a 74 % y por último para el grupo D una concentración entre 575.171 mg TE/g a 963.267 mg TE/g, para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 75 % a 90 %.

Como se observa en los resultados obtenidos anteriormente, se identificó una ligera tendencia con respecto a la TAC a medida que se incrementa el porcentaje de sólidos de cacao declarado en las muestras como se observa en la Figura 3.7. Para corroborar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes rangos de porcentajes de sólidos de cacao, se realizó una prueba de ANOVA. Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 3.7.

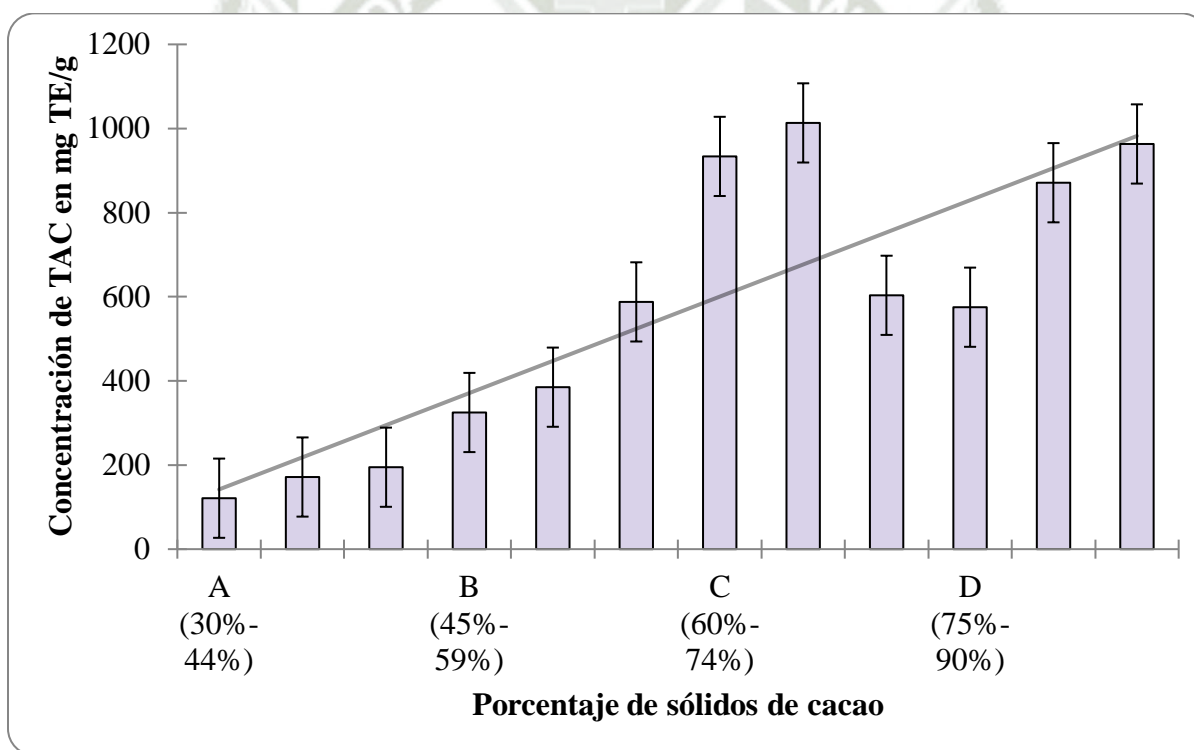


Figura 3.7 Concentración de TAC en mg TE/g en las muestras

Tabla 3.7 Prueba de ANOVA para TAC en chocolates

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedios de los cuadrados	F	p-valor
Regresión	3	952765.002	317588.334	11.683	0.00270758
Residuos	8	217469.116	27183.640		
Total	11	1170234.118			

De acuerdo a la prueba de ANOVA, la cual fue realizada con un nivel de confianza del 95 %, mostró un p-valor de 0.00270758 y un coeficiente de F de 11.683. Dado que el p-valor es inferior a 0.05 ($p < 0.05$), se señala que existe una diferencia significativa entre el TAC en los diferentes grupos de muestras. Para identificar las diferencias específicas entre los grupos, se llevó a cabo la prueba de Tukey, cuyos resultados se presentan en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Prueba de Tukey para TAC en chocolates

Categoría	Media	Grupos homogéneos	
C (60 % - 74 %)	850.166	X	
D (75 % - 90 %)	803.198	X	
B (45 % - 59 %)	432.586	X	X
A (30 % - 44 %)	162.47		X

Se identificó que no todos los grupos son homogéneos según la alineación de las X's, ya que cualquier par de intervalos que se traslapen de manera vertical, corresponden a pares de medias que no tienen una diferencia significativa al 95 % de confianza. Se observa que las categorías B (45 % - 59 %), C (60 % - 74 %) y D (75 % - 90 %) se traslapan verticalmente, por lo que indican una igualdad de medias; pero por la posición de las X's de manera horizontal, la categoría B (45 % - 59 %) podría ser significativamente diferente de las medias de las categorías C (60 % - 74 %) y D (75 % - 90 %) pero, no habría suficiente información para determinar si además esta difiere de la media de la categoría A (30 % - 44 %); ya que esta última se traslapa con la categoría B (45 % - 59 %) de manera vertical.

Los valores obtenidos para la TAC por el método de CUPRAC en las muestras de chocolate se encuentran comprendidos en general entre 162.470 mgTE/g a 850.166 mgTE/g; estos van en incremento conforme al porcentaje de cacao declarado en los productos aumenta, es así

que para chocolates con leche se tiene el menor valor (162.470 mgTE/g) y para chocolates amargos o también llamados bitter, el valor más alto (850.166 mgTE/g).

Diversos autores realizaron estudios en chocolates como en nuestro caso, tales como Polišński et al. (2021) y Cerit et al. (2023). Polinski *et. al.* en el año 2021, analizó TAC en chocolates amargos usando el mismo método descrito en este trabajo y reporta un valor de 2895 $\mu\text{mol TE/g}$, el cual convertido a nuestras unidades da como resultado una concentración de 747.22 mg TE/g, valor que es similar al reportado en la Tabla 3.4 para chocolates amargos; y es que según el CODEX ALIMENTARIO, se considera como chocolate amargo a todo aquel chocolate que declare tener un porcentaje de cacao de no menos del 40% y en nuestra investigación reportamos un valor comprendido entre 432 mg TE/g a 850 mg TE/g para un rango de chocolates comprendido entre 45% a 90%. Por otro lado, Cerit *et al.* este año también encontró una concentración promedio similar a la reportada en este estudio, la cual fue 197.76 mg TE/g, esto para chocolates con porcentaje de cacao mayor al 35 % (17,46,53).

Por otro lado, Kurtlar Tugba en el año 2011 reporta como valor máximo para capacidad antioxidante en chocolates usando el método CUPRAC, una concentración de 6668.15 $\mu\text{mol TE/100 g}$, que convertido a nuestras unidades corresponde a un valor de 16.69 mg TE/g, esto para chocolates con un porcentaje de cacao de 65%. Asu vez, Mikolajczak y Tánska (2021) reportan un valor mayor al indicado por Kurtlar Tugba (2011) pero menor en relación al nuestro, con una concentración de 28.79 mM TE/ 100 g, que en nuestras unidades corresponde a un valor promedio de 72.06 mg TE/g para chocolates comprendidos entre 65 % a 90 %. Ambos autores tienen procesos de extracción y elaboración diferentes, en el caso de Kurtlar Tugba (2011), él elabora sus propios chocolates, por lo que no se podría asegurar la calidad de los mismos con respecto a chocolates de tipo comercial; y con respecto a Mikolajczak y Tánska (2021), utiliza un método de extracción con acetona, solvente que tiene una polaridad baja con respecto al metanol, solvente que fue utilizado para la preparación de los extractos en este trabajo. Ciertamente estos resultados indicarían que tanto la elaboración, obtención y extracción pueden cambiar en gran medida los valores de la capacidad antioxidante (12,54).

4. Determinación de catequina y epicatequina por HPLC

4.1. Tiempo de retención

Se realizó una mezcla de los analitos a identificar, en este caso (+)-catequina y (-)-epicatequina. El tiempo de retención de (+)-catequina fue 3.35 minutos y para (-)-epicatequina fue de 6.66 minutos, tal y como se observa en la Figura 3.8.

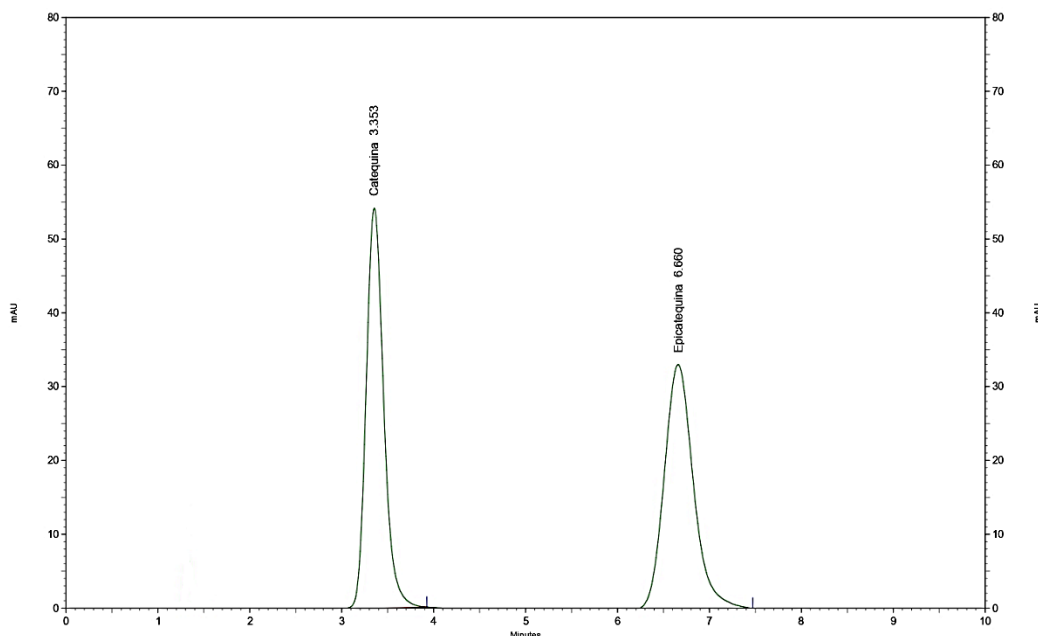


Figura 3.8 Cromatograma del tiempo de retención de (+)-catequina y (-)-epicatequina en HPLC

4.2. Estandarización del método analítico

4.2.1. Linealidad

Con el fin de determinar que existe un comportamiento lineal entre la concentración del analito y su respuesta (28), se obtuvo un gráfico de calibración para cada estándar utilizado, en este caso (+)-catequina y (-)-epicatequina, a las concentraciones de 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm y 300 ppm, como se observan en la Figuras 3.9 y 3.10. Además, en las Tablas 3.9 y 3.10 se registra un resumen de los datos evaluados y en la Figura 3.11 se observan los cromatogramas de la gráfica de calibración.

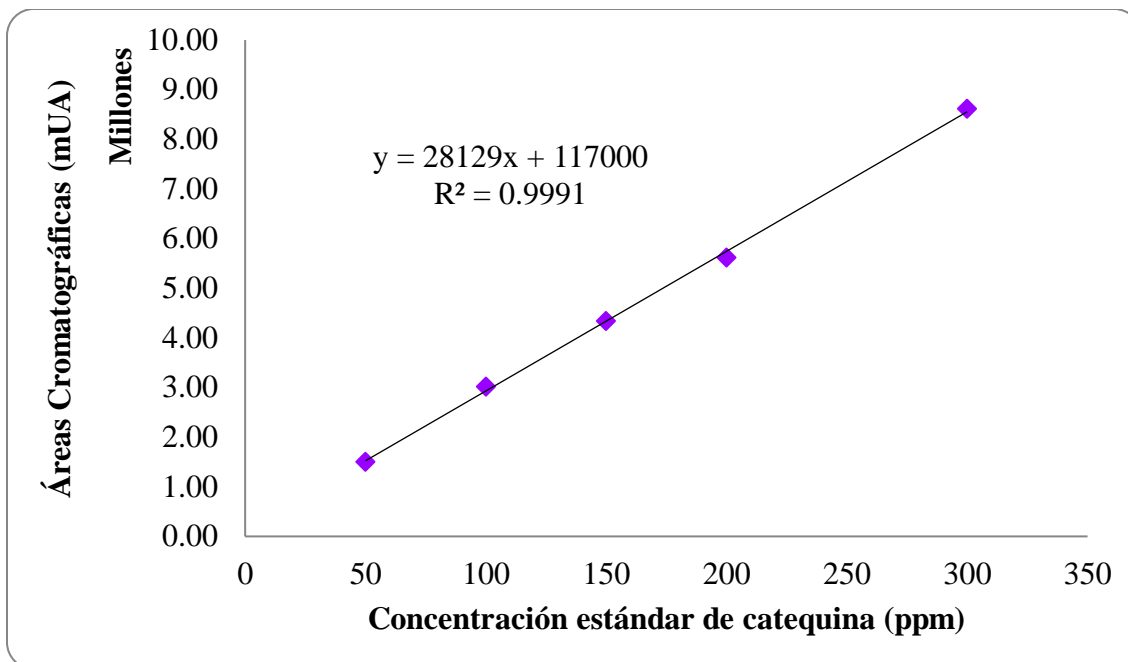


Figura 3.9 Gráfica de calibración de (+)-catequina en HPLC ($k = 3$)

k: número de repeticiones

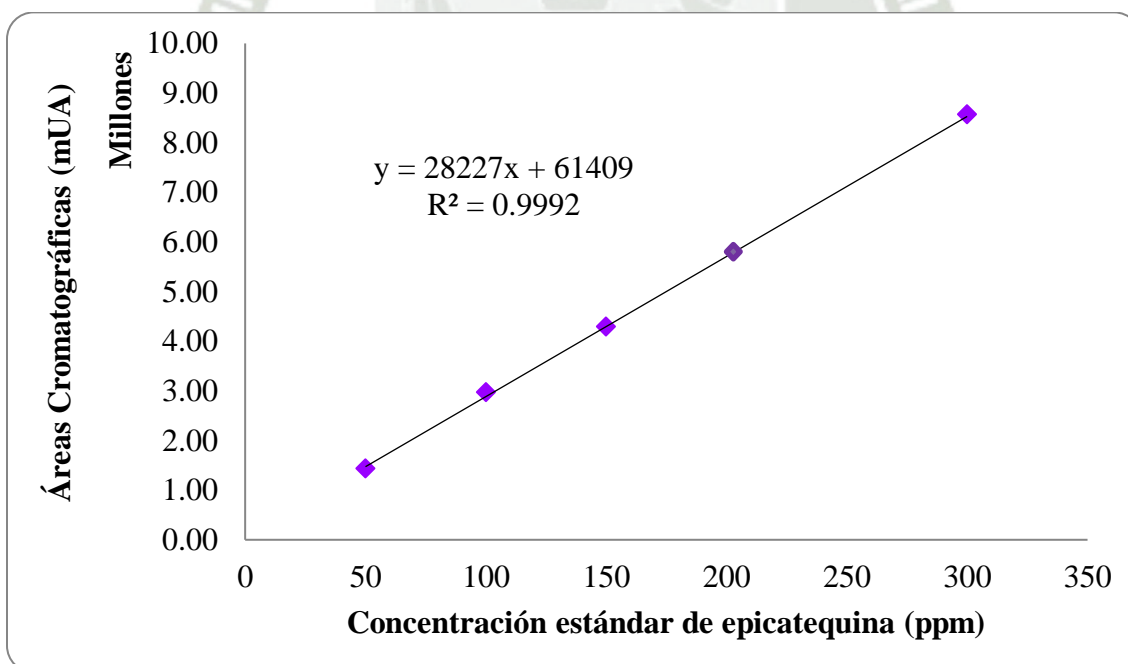


Figura 3.10 Gráfica de calibración de (-)-epicatequina en HPLC ($k = 3$)

k: número de repeticiones

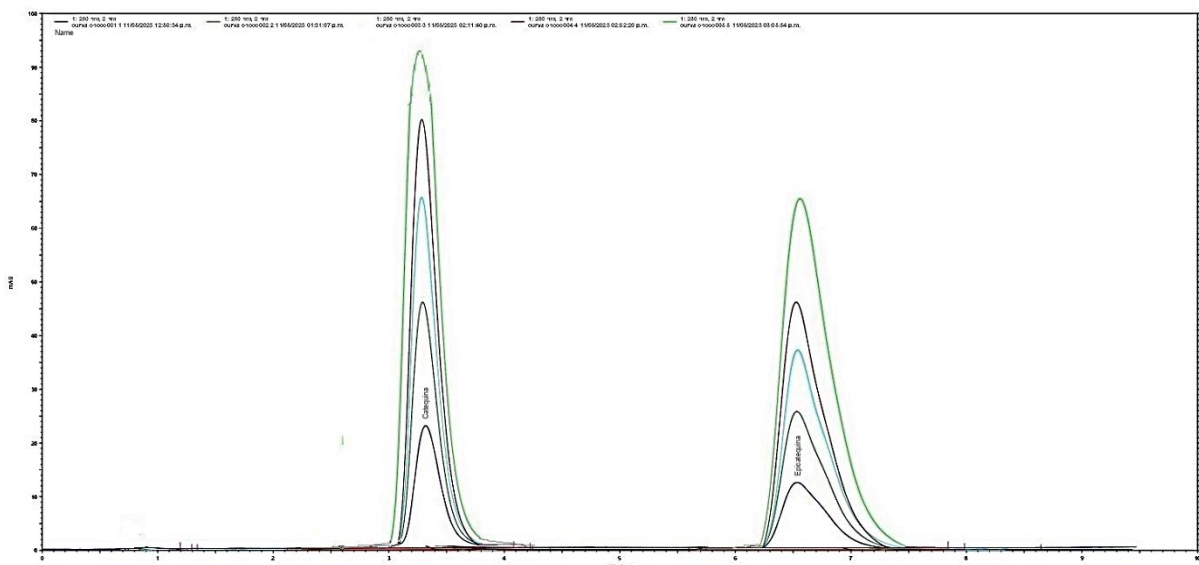


Figura 3.11 Cromatogramas de la gráfica de calibración de (+)-catequina y (-)-epicatequina en HPLC

Como se observan en las Figuras 3.9 y 3.10, se obtuvieron valores de pendiente 28129 ppm^{-1} para (+)-catequina y 28227 ppm^{-1} para (-)-epicatequina. El valor del coeficiente de correlación (R) fue de 0.99924 y 0.99939 respectivamente, lo cual indica que hay un buen grado de correlación entre el área obtenida y su respectiva concentración.

Tabla 3.9 Registro de los datos evaluados para determinar la linealidad en el método de determinación de (+)-catequina en HPLC

Concentración (ppm)	Áreas Cromatográficas (mUA)			Promedio	St. Dev	C.V.
	Área I	Área II	Área III			
50	1495220	1501234	1503570	1500008.000	4307.892	0.29
100	3015432	3016008	3023441	3018293.667	4467.015	0.15
150	4341844	4349431	4330068	4340447.667	9756.729	0.22
200	5602451	5632079	5620101	5618210.333	14904.213	0.26
300	8619916	8600169	8612803	8610962.667	10001.306	0.12

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Tabla 3.10 Registro de los datos evaluados para determinar la linealidad en el método de determinación de (-)-epicatequina en HPLC

Concentración (ppm)	Áreas Cromatográficas (mUA)			Promedio	St. Dev	C.V.
	Área I	Área II	Área III			
50	1440096	1428883	1458484	1442487.667	14944.727	1.04
100	2989861	2973744	2965541	2976382.000	12372.748	0.42
150	4276915	4264441	4339379	4293578.333	40151.911	0.93
200	5630151	5575654	5596606	5600803.667	27489.926	0.49
300	8581671	8579609	8565030	8575436.667	9071.218	0.11

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Para ratificar si existía correlación o no entre las áreas que se obtuvieron, se usó la prueba de T-student donde se determinó el T_r y el T Crítico para cada uno de los estándares evaluados. En las Tablas 3.11 y 3.12, se observan los valores de T crítico calculados para cada estándar cuyos valores son 44.63 para (+)-catequina y 49.75 para (-)-epicatequina. El valor de T crítico obtenido mediante tabla de 2 colas a un nivel de confianza al 95 % y $n-2$ grados de libertad es 2.3534 para ambos.

Como se puede apreciar, los valores de T_r para ambos estándares son mayores que el T crítico, por lo que se puede afirmar que existe una correlación lineal significativa.

Tabla 3.11 Resultados estadísticos para (+)-catequina

Ecuación lineal	$y = bx + a$	$y = 28129x + 117000$
Pendiente	b	28129
Intercepto	a	117000
Coefficiente de correlación	R	> 0.999
Coefficiente de determinación	R^2	> 0.998
Nº patrones	n	5
Valor de T crítico	T crítico	2.353
Valor estimador de T student	T_r	44.630

Tabla 3.12 Resultados estadísticos para (-)-epicatequina

Ecuación lineal	$y = bx + a$	$y = 28227x + 61409$
Pendiente	b	28227
Intercepto	a	61409
Coefficiente de correlación	R	> 0,999
Coefficiente de determinación	R^2	> 0,999
N° patrones	n	5
Valor de T crítico	T crítico	2.353
Valor estimador de T student	Tr	49.749

4.2.2. Precisión

Para evaluar la precisión se tomaron en cuenta dos criterios: repetibilidad y reproducibilidad. Para la repetibilidad se realizaron seis lecturas en un mismo día que corresponden a una concentración teórica de 150 ppm tanto para (+)-catequina y (-)-epicatequina. Para calcular el coeficiente de variación se trabajó con las áreas obtenidas tal y como se muestran en las Tablas 3.13 y 3.14 y se hizo una comparación con el coeficiente de variación de Horwitz.

Tabla 3.13 Áreas cromatográficas de (+)-catequina obtenidas en un mismo día a un solo nivel

Repetición	Área Cromatográfica
I	4341844
II	4349431
III	4330068
IV	4372359
V	4365525
VI	4348650
Promedio	4351312.833
St. Dev.	15469.716
C.V.	0.356

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Tabla 3.14 Áreas cromatográficas de (-)-epicatequina obtenidas en un mismo día a un solo nivel

Repetición	Área Cromatográfica
I	4276915
II	4264441
III	4239379
IV	4279246
V	4218335
VI	4246199
Promedio	4254085.833
St. Dev.	23740.470
C.V.	0.558

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

En la Tabla 3.15 se puede apreciar que el resultado expresado en porcentaje del coeficiente de variación es de 0.36 % para (+)-catequina y 0.56 % para (-)-epicatequina; el valor obtenido para el C.V de Horwitz es de 13.29 % para ambos estándares. Dado que el valor de C.V está por debajo del C.V de Horwitz, lo cual permite concluir que el método aplicado posee repetibilidad.

Tabla 3.15 Resultados obtenidos para repetibilidad

C.V.	
Catequina	Epicatequina
0,356	0,558
C.V. Horwitz % para una concentración de 150 ppm	
13.287	

C.V.: Coeficiente de variación porcentual. C.V. Horwitz%: CV de Horwitz porcentual

Para la reproducibilidad se realizaron seis lecturas en seis días diferentes que correspondieron a una concentración teórica de 150 ppm tanto para (+)-catequina y (-)-epicatequina. Para calcular el coeficiente de variación se trabajó con las áreas obtenidas tal y como se muestran en las Tablas 3.16 y 3.17 y se hizo una comparación con el coeficiente de variación de Horwitz.

Tabla 3.16 Áreas cromatográficas de (+)-catequina obtenidas en seis diferentes días a un solo nivel

Día	Área Cromatográfica
1	4365525
2	4256941
3	4361612
4	4466168
5	4311561
6	4411519
Promedio	4362221.000
St. Dev.	73344.220
C.V.	1.681

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Tabla 3.17 Áreas cromatográficas de (-)-epicatequina obtenidas en seis diferentes días a un solo nivel

Día	Área Cromatográfica
1	4218335
2	4161656
3	4266841
4	4161681
5	4161681
6	4299461
Promedio	4211609.167
St. Dev.	60489.172
C.V.	1.436

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

En la Tabla 3.18 se puede apreciar que el resultado expresado en porcentaje del coeficiente de variación es de 1.68 % para (+)-catequina y 1.44 % para (-)-epicatequina; el valor obtenido para el C.V de Horwitz es de 17.71 % para ambos estándares. Dado que el valor de

C.V está por debajo del C.V de Horwitz, lo cual permite concluir que el método aplicado posee reproducibilidad.

Tabla 3.18 Resultados obtenidos para reproducibilidad

C.V.	
Catequina	Epicatequina
1,681	1,436
C.V. Horwitz % para una concentración de 150 ppm	
17,715	

C.V.: Coeficiente de variación porcentual. C.V. Horwitz%: CV de Horwitz porcentual

Ya que la precisión se establece en términos repetibilidad y reproducibilidad, y ambos criterios fueron aceptados; se puede concluir que el método aplicado es preciso.

4.2.3. Exactitud

Para evaluar este parámetro, se utilizó el método de recuperación y se midió la concentración de la muestra sin enriquecer, la muestra enriquecida y el estándar de (+)-catequina y (-)-epicatequina a 150 ppm. Se obtuvo un valor de porcentaje de recuperación de 91.53 % para (+)-catequina y 91.12 % para (-)-epicatequina, tal y como se observa en las Tablas 3.19 y 3.20.

Tabla 3.19 Exactitud expresada en porcentaje de recuperación para (+)-catequina

Repetición	Muestra (M)	Estándar	M + Estándar	%R
I	160.173	150.861	299.538	92.380
II	174.182	150.742	309.021	89.450
III	158.191	150.213	294.915	91.020
IV	192.395	150.955	329.371	90.740
V	180.340	151.104	318.993	91.760
VI	169.841	150.343	310.908	93.830
Promedio				91.530

%R: Porcentaje de recuperación

Los valores de porcentaje de recuperación promedio que se obtuvieron para ambos estándares se encuentran dentro del rango establecido por la AOAC (90 %-107 %) de manera que, este criterio es aceptable (Tabla 3.21) (55).

Tabla 3.20 Exactitud expresada en porcentaje de recuperación para (-)-epicatequina

Repetición	Muestra (M)	Estándar	M + Estándar	%R
I	105.632	150.364	244.357	92.259
II	110.360	150.071	245.851	90.285
III	113.458	150.288	247.545	89.220
IV	109.826	151.965	251.624	93.310
V	111.354	151.474	248.423	90.490
VI	107.927	150.126	244.752	91.140
Promedio				91.117

%R: Porcentaje de recuperación

Tabla 3.21 Porcentaje de recuperación que se espera según la concentración del analito

Concentraciones del analito	% de Recuperación
100 %	98-102
10 %	98-102
1 %	97-103
0.10 %	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

AOAC Official Methods of Analysis (2012)(55)

Con los resultados obtenidos se aplicó una prueba de T-student para evaluar la recuperación. En la Tabla 3.22 se observa que el t calculado para (+)-catequina y (-)-epicatequina fueron

de 2.31 y 2.47 respectivamente, siendo ambos menores en relación al valor de T crítico obtenido por tabla, con un valor de 2.57; por lo que se puede decir que el método de análisis es exacto.

Tabla 3.22 Resultados obtenidos para exactitud

St. Dev	
Catequina	Epicatequina
1,502	1,470
T calculado	
Catequina	Epicatequina
2,302	2,467
T crítico	
2,571	

St. Dev: Desviación estándar.

4.3. Cuantificación de (+)-catequina y (-)-epicatequina en chocolates

Los resultados de la concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina (C + EC) fueron expresados en miligramos por cada gramo de chocolate desgrasado. Los cálculos de las concentraciones se realizaron tomando en cuenta la relación entre la concentración conocida del estándar y el área de cada muestra, así como la dilución realizada. En las Tablas 3.23 y 3.24 se muestra el promedio de los resultados del contenido (+)-catequina y (-)-epicatequina respectivamente.

Para el caso de (+)-catequina, se observa que el grupo A presentó una concentración entre 1.145 mg C/g a 2.238 mg C/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 30 % a 40 %; para el grupo B una concentración entre 2.833 mg C/g a 3.757 mg C/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 45 % a 59 %; para el grupo C una concentración entre 4.574 mg C/g a 5.931 mg C/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 60 % a 74 % y por último para el grupo D, una concentración entre 5.646 mg C/g a 6.444 mg C/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 75 % a 90 %.

Para (-)-epicatequina se observa que el grupo A presentó una concentración entre 0.671 mg EC/g a 1.299 mg EC/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 30 % a 40 %; para el grupo B una concentración entre 1.123 mg EC/g a 2.687 mg EC/g para un porcentaje

declarado de sólidos de cacao entre 45 % a 59 %; para el grupo C una concentración entre 2.256 mg EC/g a 4.512 mg EC/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 60 % a 74 % y por último para el grupo D, una concentración entre 2.170 EC/g a 4.462 mg C/g para un porcentaje declarado de sólidos de cacao entre 75 % a 90 %.

Tabla 3.23 Contenido de (+)-catequina expresado en mg/g

Grupo	Muestras	Concentración (mg C/g)			Promedio	St. Dev.	C.V.
		Lote 1	Lote 2	Lote 3			
A (30 % - 44 %)	TTB	1.543	1.119	0.785	1.149	0.380	0.33
	IRP	2.160	2.441	2.113	2.238	0.178	0.08
	MIP	2.043	2.173	2.194	2.137	0.082	0.04
B (45 % - 59 %)	ADP	2.990	2.788	3.501	3.093	0.367	0.12
	AAA	2.997	3.024	2.477	2.833	0.308	0.11
	FIP	3.995	3.454	3.823	3.757	0.276	0.07
C (60 % - 74 %)	PIP	5.755	5.146	5.562	5.488	0.311	0.06
	BRP	6.278	5.926	5.590	5.931	0.344	0.06
	HHB	4.479	4.795	4.448	4.574	0.192	0.04
D (75 % - 90 %)	DEP	5.592	5.721	5.626	5.646	0.067	0.01
	BBB	6.117	6.097	6.008	6.074	0.058	0.01
	LLF	6.505	6.531	6.297	6.444	0.128	0.02

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Tabla 3.24 Contenido de (-)-epicatequina expresado en mg/g

Grupo	Muestras	Concentración (mg EC/g)			Promedio	St. Dev.	C.V.
		Lote 1	Lote 2	Lote 3			
A (30 % - 44 %)	TTB	0.558	0.715	0.740	0.671	0.099	0.15
	IRP	1.126	1.044	1.078	1.083	0.041	0.04
	MIP	1.204	1.330	1.363	1.299	0.084	0.06
B (45 % - 59 %)	ADP	0.886	1.123	1.358	1.123	0.236	0.21
	AAA	2.371	3.529	2.162	2.687	0.736	0.27
	FIP	2.350	1.784	2.481	2.205	0.370	0.17
C (60 % - 74 %)	PIP	4.042	3.407	4.010	3.819	0.358	0.09
	BRP	4.138	5.053	4.343	4.512	0.480	0.11
	HHB	2.213	2.477	2.078	2.256	0.203	0.09
D (75 % - 90 %)	DEP	2.122	2.171	2.217	2.170	0.048	0.02
	BBB	4.345	4.455	4.587	4.462	0.121	0.03
	LLF	4.329	3.993	4.308	4.210	0.188	0.04

St. Dev: Desviación estándar. C.V.: Coeficiente de variación porcentual.

Para fines de este estudio, se decidió sumar las concentraciones obtenidas de (+)-catequina y (-)-epicatequina con el propósito de facilitar la comparación con las otras variables de este estudio. Esta sumatoria se muestra en la Tabla 3.25.

Tabla 3.25 Sumatoria del contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina expresado en mg/g

Grupo	Muestras	Concentración (mg/g)		Suma	Promedio
		(+)-catequina	(-)-epicatequina		
A (30 % - 44 %)	TTB	1.149	0.671	1.820	2.859
	IRP	2.238	1.083	3.321	
	MIP	2.137	1.299	3.436	
B (45 % - 59 %)	ADP	3.093	1.123	4.215	5.233
	AAA	2.833	2.687	5.520	
	FIP	3.757	2.205	5.962	
C (60 % - 74 %)	PIP	5.488	3.819	9.307	8.860
	BRP	5.931	4.512	10.443	
	HHB	4.574	2.256	6.830	
D (75 % - 90 %)	DEP	5.646	2.170	7.816	9.669
	BBB	6.074	4.462	10.536	
	LLF	6.444	4.210	10.654	

En base a los resultados obtenidos anteriormente, en la Figura 3.12 se aprecia un ligero incremento gradual con algunas fluctuaciones de la concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina a medida que aumenta el porcentaje de sólidos de cacao declarado en las muestras. Para ello se llevó a cabo una prueba de ANOVA para verificar si existen diferencias significativas entre los distintos rangos de porcentajes de sólidos de cacao. Los resultados se muestran en la Tabla 3.26.

Tabla 3.26 Prueba de ANOVA para el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedios de los cuadrados	F	p-valor
Regresión	3	91.133	30.378	15.927	0.00097944
Residuos	8	15.258	1.907		
Total	11	106.392			

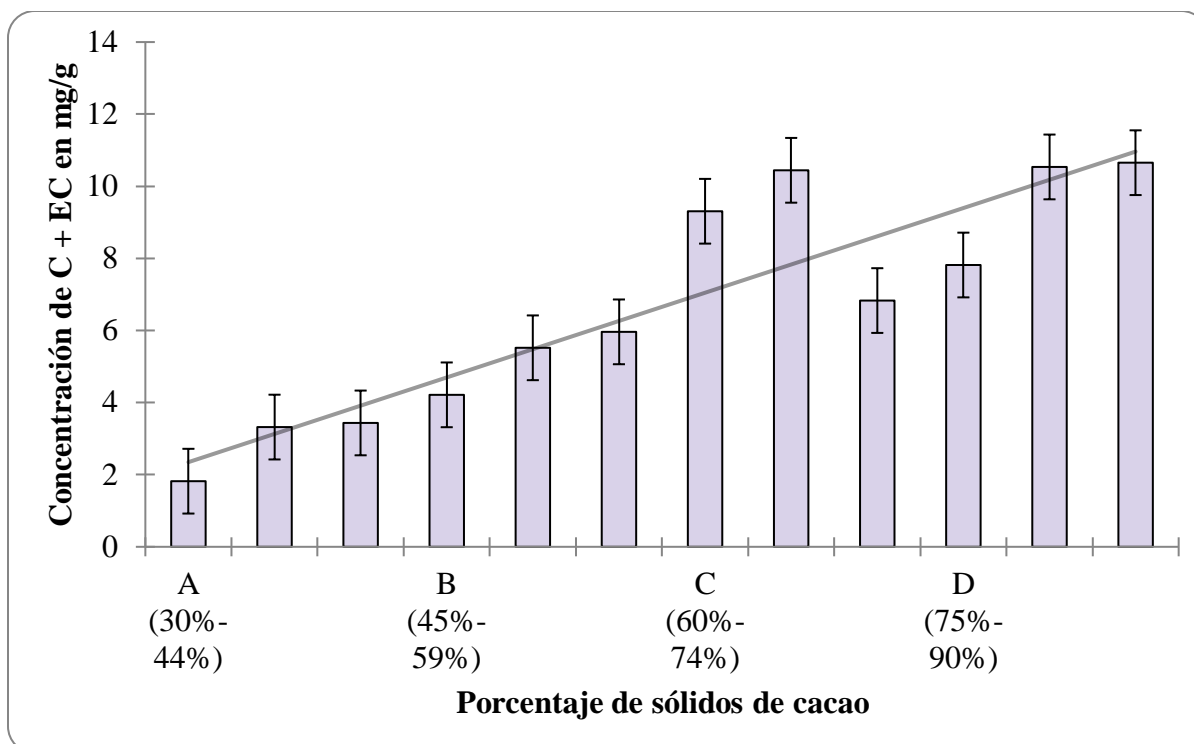


Figura 3.12 Concentración de C + EC en las muestras

Según los resultados de la prueba de ANOVA para (+)-catequina y (-)-epicatequina, realizada con un nivel de confianza del 95%, se obtuvo un p-valor de 0.00097944 y un coeficiente de F de 15.927. Debido a que el valor de p es menor a 0.05 ($p < 0.05$), señala que existe una diferencia significativa en el contenido de C + EC entre los diferentes grupos de muestra. Para determinar las diferencias específicas entre los grupos se llevó a cabo la prueba de Tukey, cuyos resultados se presentan en la Tabla 3.27.

Tabla 3.27 Prueba de Tukey para el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina

Categoría	Media	Grupos homogéneos
D (75 % - 90 %)	9.669	X
C (60 % - 74 %)	8.860	X
B (45 % - 59 %)	5.232	X
A (30 % - 44 %)	2.859	X

En la Tabla 3.27 se identificó que no todos los grupos son homogéneos según la alineación de las X's, ya que cualquier par de intervalos que no se traslapen de manera vertical, corresponden a pares de medias que tienen una diferencia significativa al 95 % de confianza.

Se observa que las categorías D (75 % - 90 %) y C (60 % - 74 %) se traslapan verticalmente, por lo que indican una igualdad de medias, al igual como sucede con las categorías B (45 % - 59 %) y A (30 % - 44 %); por lo que la agrupación de estas categorías respectivamente, presentan una diferencia estadísticamente diferente.

El análisis de la concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina en diferentes tipos de chocolate se realizó debido a que estas sustancias son conocidas por sus propiedades antioxidantes.(56) Para evaluar su presencia, se midió la concentración de ambos compuestos y se comparó la suma de sus valores con información disponible en la bibliografía. Nuestros resultados coinciden con estudios previos realizados por Gu et al (2006) y Santos et al (2022), quienes encontraron una relación entre el aumento en el contenido de sólidos de cacao y la concentración de C + EC. Gu et al (2006) reportó una concentración de C + EC en chocolates con leche de 0.32 mg/g y para chocolates oscuros de 1.58 mg/g mientras que, Santos et al (2022) encontró un valor de 0.42mg /g para un chocolate con leche a 30 % y 1.21 mg/g para un chocolate oscuro al 90 %, lo cual refleja un aumento a medida que se incrementa el contenido de sólidos de cacao en chocolates (11,57).

Para analizar en detalle las diferencias específicas entre los grupos de estudio se aplicó la prueba de Tukey y esta reveló una mayor concentración de C + EC en el grupo D (75 %-90 %) con una media aproximada de 9.669 mg/g de C + EC, valor cercano al obtenido en el grupo C (60 %-74 %) por lo que, es importante destacar que existe un fenómeno particular que se ha observado en chocolates con alto contenido de sólidos de cacao, y es que no siempre se obtienen mayores valores de concentración de C + EC al tener un mayor porcentaje de los mismos; por ejemplo, Gottumakkala et al (2014) examinó chocolates comerciales y encontró que un chocolate con un 70% de cacao tenía una concentración de C + EC de 0.91 mg /g mientras que, un chocolate de 90% de cacao tenía una concentración mucho menor de 0.58 mg/g además, M.M. Nascimento et al (2022) registró valores de 1.76 mg/g para un chocolate al 70 % y 1.74 mg/g para otro chocolate al 85 %. Estas discrepancias podrían indicar la presencia de otros factores que pueden influir en las concentraciones de los analitos estudiados en las muestras (58,59).

Por otro lado, se observó una mayor concentración de (+)-catequina que de (-)-epicatequina, y es que en general el chocolate contiene ambos analitos, pero su proporción varía dependiendo del tipo de chocolate y proceso de fabricación ya que, durante el procesamiento

del cacao pueden producirse cambios en la composición en estos flavanoles. Lambert (2017) sugiere que las reacciones de polimerización ocurren durante el proceso de elaboración de chocolate, donde la (-)-epicatequina se transforma en (+)-catequina, además, Ioannone et al (2015) mencionan que la degradación de (-)-epicatequina es más rápida que la de (+)-catequina (60,61).

Estos hallazgos resaltan la complejidad de la composición de los chocolates y cómo diversos factores, además del contenido de sólidos de cacao, pueden influenciar la concentración de los compuestos de (+)-catequina y (-)-epicatequina.

5. Correlación entre TPC, TAC y C + EC

Antes de realizar la prueba de correlación, se verificó que los datos obtenidos siguieran una distribución normal, para ello se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (S-W), esta prueba se utiliza para evaluar si una muestra de datos sigue una distribución normal por lo que, si el valor p asociado con la prueba S-W es mayor que un nivel de significancia predeterminada no se rechaza la hipótesis nula y se puede concluir que los datos siguen una distribución normal pero, si el valor p es menor se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no siguen una distribución normal.

En la Tabla 3.28 se muestran los valores de p y el estadístico de Shapiro. Se trabajó a un nivel de confianza del 95 % y todos los p valor obtenidos fueron mayores a 0.05 ($p > 0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 3.28 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (S-W) en muestras de chocolate

Grupo	Prueba de S-W	TPC	TAC	C+ EC
A (30 % - 44 %)	W-stat	0.978	0.957	0.803
	p value	0.716	0.602	0.122
B (45 % - 59 %)	W-stat	0.948	0.911	0.925
	p value	0.562	0.421	0.469
C (60 % - 74 %)	W-stat	0.847	0.889	0.956
	p value	0.233	0.352	0.597
D (75 % - 90 %)	W-stat	0.910	0.916	0.781
	p value	0.419	0.438	0.070

W-stat: Estadístico de Shapiro. p value: valor p

Una vez verificada la normalidad de los datos, se investigaron las correlaciones entre TPC, TAC y concentración de C + EC de las muestras de chocolate mediante la prueba de correlación de Pearson, este método estadístico evalúa la relación lineal entre dos variables y se obtienen dos valores: el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el p valor.

El valor (r) puede variar entre -1 y 1, un valor cercano a 1 indica una correlación positiva fuerte, un valor cercano a -1 indica una correlación negativa fuerte y un valor cercano a 0 indica una correlación débil o inexistente (62).

El p valor indica la significancia estadística de la correlación observada, si este es menor que un nivel de significancia predefinido se puede concluir que hay una correlación significativa (62).

En la Tabla 3.29 se muestran los valores de r y el p valor de la prueba de correlación de Pearson. Al comparar los valores obtenidos de TPC, TAC y C + EC, se encontraron valores de r altamente correlacionados ($0.8 < r < 1$).

El nivel de significancia para este estudio fue de 0.05 y los únicos pares que obtuvieron un valor menor a este ($p < 0.05$) fueron TPC vs TAC en todos los grupos de estudio que son A (30 % - 44 %), B (45 % - 59 %), C (60 % - 74 %) y D (75 % - 90 %).

En base a estos resultados, se puede afirmar que existe una correlación altamente significativa entre los niveles de TPC y TAC en todos los grupos de muestras investigadas. Kurtlar Tugba en el año 2011 estudio el cambio de la capacidad antioxidante de chocolates con diversos métodos para TAC (FRAP, CUPRAC, DPPH y ABTS), y realizó una correlación entre estos y el contenido de polifenoles totales, obteniendo un valor de r igual a 0.972 para la correlación de TPC y TAC por el método de CUPRAC, demostrando que existe una correlación altamente significativa entre estas dos variables al igual que en este estudio ($r = 0.998$) (54).

A pesar de haber encontrado un coeficiente de correlación (valor r) que muestra una relación positiva entre los niveles de TPC, TAC con C + EC, no se pudo demostrar que estos fueran estadísticamente significativos ($p > 0.05$) y pudiera así respaldar la importancia de estas asociaciones por lo tanto, se plantea que estas correlaciones pueden no ser representativas de una población en general debido a la presencia de una variabilidad en las muestras, esta podría atribuirse a múltiples factores como las características genéticas de las plantas de cacao, distintas ubicaciones geográficas, condiciones de cosecha y postcosecha, entre otros (63).

Tabla 3.29 Correlación de Pearson entre TPC, TAC y C+ EC

Grupo	Correlación de Pearson	TPC	TAC	C + EC	
A (30 % - 44 %)	TPC	r		0.998	
		valor p		0.038	
	TAC	r	0.998		0.969
		valor p	0.038		0.160
	C + EC	r	0.952	0.969	
		valor p	0.198	0.160	
B (45 % - 59 %)	TPC	r		0.997	
		valor p		0.047	
	TAC	r	0.997		0.836
		valor p	0.047		0.370
	C + EC	r	0.874	0.836	
		valor p	0.323	0.370	
C (60 % - 74 %)	TPC	r		0.998	
		valor p		0.040	
	TAC	r	0.998		0.992
		valor p	0.040		0.082
	C + EC	r	0.982	0.992	
		valor p	0.121	0.082	
D (75 % - 90 %)	TPC	r		1.000	
		valor p		0.006	
	TAC	r	1.000		0.982
		valor p	0.006		0.122
	C + EC	r	0.983	0.982	
		valor p	0.116	0.122	

En cuanto al contenido de compuestos fenólicos, este se ve influenciado por la variedad de cacao utilizado y es que, cada variedad de cacao tiene características genéticas específicas que determinan su perfil químico y su potencial para producir compuestos fenólicos. Un estudio realizado por Tomas-Barberan et al. en el año 2007 en granos de cacao secos de diferentes variedades y países, mostró que el TPC de la variedad Criollo de Perú presenta 50.00 mg GA/g a diferencia de República Dominicana que es la misma variedad y la cual presenta 40.00 mg GA/g; así mismo, en Ecuador la variedad Clone CCN51 presenta un TPC de 84.20 mg GA/g y en Venezuela la variedad Trinitario mostró un TPC de 64.30 GA/g. Esto nos indica que algunas variedades de cacao tienen una mayor capacidad para sintetizar y acumular compuestos fenólicos,

por lo que su capacidad antioxidante también se vería influenciada por estos factores(64); lo mismo sucedería con respecto al contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina, y es que según Niemenak et al. (2006) y Jalil e Ismail (2008), la fracción de estos compuestos depende de la región geográfica de cultivo, por lo que al ser el grano de cacao el ingrediente principal en la elaboración de chocolates, los valores que estos se expresan en el análisis del producto terminado serían también variables y diferentes (65,66).

Además cabe mencionar que, en las etapas del procesamiento de los granos de cacao para producir chocolate (fermentación, secado, tostado), los compuestos fenólicos pueden sufrir modificaciones y cambios químicos y físicos por ejemplo, en el tratamiento térmico de los granos de cacao en particular durante la molienda y el conchado del licor de cacao, la concentración de antioxidantes se reduce.(67) Por otro lado, Pascual V. et al, menciona que una gran mayoría de productos derivados del cacao presentan menos del 50% de cacao en sus formulaciones por lo que, el efecto antioxidante que promociona disminuye por la menor riqueza en flavonoides (68).

Por último, existe evidencia que sugiere que consumir chocolates con un contenido de cacao superior al 75 %, puede considerarse una práctica saludable por lo que se recomienda consumir entre 20 a 40 gramos de chocolate de este tipo de dos a tres veces por semana sin embargo, es importante destacar que consumir mayores cantidades de chocolate con mayor porcentaje de cacao no aportaría mayores beneficios con respecto a la propiedad antioxidantes que este producto ofrece ya que en nuestra investigación, se demuestra claramente que a medida que se incrementa el porcentaje de cacao no necesariamente el TPC, TAC y C + EC aumenta, por lo que consumir chocolates que se encuentren en un rango entre 75 % a 90 %, aportarían los mismos beneficios sin tomar en cuenta el porcentaje de cacao declarado (68,69).

CONCLUSIONES

PRIMERO:

Se determinó la concentración de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu en los grupos de muestras establecidos, siendo estos para el grupo A (30% - 44%) 27.725 mg GA/ g, B (45% - 59%) 80.426 mg GA/g, C (60% - 74%) 128.629 mg GA/g y D (75% - 90%) 122.015 mg GA/g.

SEGUNDO:

Se determinó la concentración de capacidad antioxidante por el método de CUPRAC en los grupos de muestras establecidos, siendo estos para el grupo A (30% - 44%) 162.470 mg TE/ g, B (45% - 59%) 432.586 mg TE/g, C (60% - 74%) 850.166 mg TE/g y D (75% - 90%) 803.198 mg TE/g.

TERCERO:

Se hizo la estandarización de la técnica cromatográfica de HPLC para determinar (+)-catequina y (-)-epicatequina en chocolates, a través de los parámetros de linealidad con un $R^2 = 0.9991$ para (+)-catequina y 0.9992 para (-)-epicatequina; precisión con un C.V.% de 0.36 para (+)-catequina y 0.56 para (-)-epicatequina en el criterio de repetibilidad y 1.68 para (+)-catequina y 1.44 para (-)-epicatequina en el criterio de reproducibilidad; y por último en exactitud con un %R = 91.53 para (+)-catequina y 91.12 para (-)-epicatequina, siendo datos aceptables por la AOAC.

Se determinó la concentración de (+)-catequina y (-)-epicatequina HPLC en los grupos de muestras establecidos, siendo estos para el grupo A (30% - 44%) 2.859 mg C + EC/ g, B (45% - 59%) 5.233 mg C + EC/g, C (60% - 74%) 8.858 mg C + EC/g y D (75% - 90%) 9.669 mg C + EC/g.

CUARTO:

Se demostró mediante la prueba de correlación de Pearson que existe una correlación altamente significativa entre los niveles de polifenoles totales y capacidad antioxidante con un valor de correlación (r) promedio de 0.998 y un p-valor de 0.0327 para todos los grupos. Con respecto a la relación entre polifenoles totales y capacidad antioxidante con el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina, se obtuvo un valor de correlación promedio (r) de 0.946 y un valor p de 0.174, el cual indica que hay una fuerte correlación entre las variables pero que no llegaría a ser estadísticamente significativa.

RECOMENDACIONES

1. Para futuros estudios se recomienda realizar además un análisis químico proximal para así poder comprender qué otros factores podrían influenciar en las concentraciones de los analitos estudiados.
2. Analizar otras matrices de chocolates que incluyan el uso diferentes aditivos como rellenos, frutas deshidratadas, frutos secos, cremas, edulcorantes, entre otros.
3. Realizar estudios adicionales con una mayor cantidad de muestras para conseguir evidencia estadísticamente significativa para establecer una correlación entre el contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante con el contenido de (+)-catequina y (-)-epicatequina.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hinostroza S. Perfil químico-nutricional y actividad antioxidante del chocolate “Valle del Chanca” [Internet]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017 [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/754/Perfil_HinostrozaEslava_Sara.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2. Producción nacional de cacao en grano creció en la última década a un promedio de 12.6% al año - Noticias - Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - Plataforma del Estado Peruano [Internet]. [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/305143-produccion-nacional-de-cacao-en-grano-crecio-en-la-ultima-decada-a-un-promedio-de-12-6-al-ano>
3. Perez M, Lopez-Yerena A, Vallverdú-Queralt A. Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: a challenge for the chocolate industry. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2021 [citado el 30 de mayo de 2023];62(2):475–89. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=bfsn20>
4. Quelal OM, Hurtado DP, Benavides AA, Alanes PV, Alanes NV. Key Aromatic Volatile Compounds from Roasted Cocoa Beans, Cocoa Liquor, and Chocolate. *Fermentation*. el 1 de febrero de 2023;9(2).
5. Alañón ME, Castle SM, Siswanto PJ, Cifuentes-Gómez T, Spencer JPE. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. *Food Chem* [Internet]. el 1 de octubre de 2016 [citado el 30 de mayo de 2023];208:177–84. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461630499X
6. Todorovic V, Redovnikovic IR, Todorovic Z, Jankovic G, Dodevska M, Sobajic S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis* [Internet]. el 1 de agosto de 2015 [citado el 30 de mayo de 2023];41:137–43. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088915751500071X>
7. Field DT, Williams CM, Butler LT. Consumption of cocoa flavanols results in an acute improvement in visual and cognitive functions. *Physiol Behav* [Internet]. el 1 de junio de

- 2011 [citado el 30 de mayo de 2023];103(3–4):255–60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21324330/>
8. Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E. Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Nutrients* [Internet]. 2013 [citado el 30 de mayo de 2023];5:4159–73. Disponible en: www.mdpi.com/journal/nutrients
 9. Vinson JA, Motisi MJ. Polyphenol antioxidants in commercial chocolate bars: Is the label accurate? *J Funct Foods*. el 1 de enero de 2015;12:526–9.
 10. Jaćimović S, Popović-Djordjević J, Sarić B, Krstić A, Mickovski-Stefanović V, Pantelić N. Antioxidant Activity and Multi-Elemental Analysis of Dark Chocolate. *Foods* [Internet]. el 1 de mayo de 2022 [citado el 31 de mayo de 2023];11(10). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/10/1445>
 11. Gu L, House SE, Wu X, Ou B, Prior RL. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *J Agric Food Chem* [Internet]. el 31 de mayo de 2006 [citado el 30 de mayo de 2023];54(11):4057–61. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf060360r>
 12. Mikołajczak N, Tan´ska M, Tan´ska T. Relationships between cocoa mass percentage, surface color, free phenolic compounds content and antioxidant capacity of commercially available dark chocolate bars. [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04898-1>
 13. Gutiérrez BE. Estudio agromorfológico y fisicoquímico de los ecotipos de cacao cultivados en los municipios de Izalco y Nahulingo, en el Departamento de Sonsonate en El Salvador [Internet]. [El Salvador]: Universidad Dr. Jose Matias Delgado; 2011 [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://webquery.ujmd.edu.sv/siab/bvirtual/BIBLIOTECA%20VIRTUAL/TESIS/04/IAL/ADTESGE0001258.pdf>
 14. Bhattacharjee R, Akoroda M. Taxonomy and classification of cacao. En: *Achieving sustainable cultivation of cocoa* [Internet]. Cambridge; 2018 [citado el 30 de mayo de 2023]. p. 3–18. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10568/97527>
 15. Bobadilla J. Composición químico-nutricional, fenólicos, metilxantinas, compuestos volátiles y actividad antioxidante de la cobertura de chocolate “La Ibérica” [Internet].

- [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016 [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/4354>
16. Afoakwa EO. Industrial Chocolate Manufacture- Processes and Factors Influencing Quality. *Chocolate Science and Technology* [Internet]. el 19 de febrero de 2010 [citado el 30 de mayo de 2023];35–57. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/40904769_Chocolate_Science_and_Technology
 17. Norma para el chocolate y los productos del chocolate [Internet]. Codex Alimentarius . Codex Stan 87-1981; [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS_087s.pdf
 18. Tafurt G, Suarez O, Del M, Lares C, Liconte N. Capacidad antioxidante de un chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar. *Revista Digital de Postgrado UCV* [Internet]. el 30 de octubre de 2021 [citado el 30 de mayo de 2023];10(1):2021. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/02/1147585/20297-144814493257-1-pb.pdf>
 19. Efecto del consumo de chocolate oscuro de granos cacao sin fermentar, sobre marcadores de estrés oxidativo y, disfunción endotelial en una población sana. [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=170263775008>
 20. Huamani D, Paucar P. Determinacion del contenido de ácido ascórbico y capacidad antioxidante del fruto liofilizado de pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) y pitaha roja (*Hylocereus undatus*) [Internet]. [Arequipa]: Universidad Católica de Santa María ; 2018 [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/8275>
 21. Criado C, Manuel D, Mir SM. Vitaminas y antioxidantes. 2009 [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: www.elmedicointeractivo.com/Documentos/Evaluacion
 22. Ibrić A, Čavar S. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Cocoa and Chocolate Products. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* [Internet]. 2014 [citado el 30 de mayo de 2023];(42):37–70. Disponible en: <https://hemija.pmf.unsa.ba/glasnik/files/Issue%2042/Issue%2042%20novo/42-7-Ibric.pdf>
 23. Arla Foods Barilla BASF Aktiengesellschaft Bayer CropScience-BioScience A. ACERCA DEL ILSI / ILSI EUROPE Miembros del Consejo Directivo del ILSI Europe Empresas

- integrantes del Grupo de Expertos sobre Alimentos Funcionales del ILSI Europe. 2002 [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <http://europe.ilsis.org>
24. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits [Internet]. Disponible en: www.elsevier.com/locate/foodchem
 25. Perez L, Garcia L, González R, Rodriguez J, Rosas E, Huerta J, et al. Liberación de compuestos fenólicos ligados en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) utilizando microbiota humana intestinal. *Biotecnia* [Internet]. octubre de 2018 [citado el 30 de mayo de 2023];20(3):146–54. Disponible en: <http://biotecnia.unison.mx>
 26. Peñarrieta JM, Tejata L, Mollinedo P, Vila J, Bravo J. Phenolic Compounds in Food. *Bolivian Journal of Chemistry* [Internet]. el 21 de diciembre de 2014 [citado el 30 de mayo de 2023];31(2):68–81. Disponible en: <http://www.bolivianchemistryjournal.org>, <http://www.scribd.com/bolivianjournalofchemistry>
 27. Akpa Eugène, N'guessan E, Robert B, Ganiyou A, Denis YK, Ané A, El B, et al. Catechin and Epicatechin. What's the More Reactive? *Computational Chemistry* [Internet]. 2022 [citado el 30 de mayo de 2023];10:53–70. Disponible en: <https://doi.org/10.4236/cc.2022.102003>
 28. Ramalho SA, Carvalho Gualberto N, Santos MT, Neta L, Andrade Batista R, Araújo M, et al. Catechin and Epicatechin Contents in Wines Obtained from Brazilian Exotic Tropical Fruits. *Food Nutr Sci* [Internet]. 2014 [citado el 30 de mayo de 2023];5:449–57. Disponible en: <http://www.scirp.org/journal/fns>
 29. Biosíntesis SU, Biológica YA, Martín DA. Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* [Internet]. el 26 de febrero de 2018 [citado el 30 de mayo de 2023];9(1):81–104. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1968/2366>
 30. Pérez Jiménez J. Potencial de los Polifenoles de la dieta (extraíbles y no extraíbles) en la prevención de enfermedades cardiometabólicas. *ANALES RANM* [Internet]. 2019 [citado el 30 de mayo de 2023];298–307. Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/203836/3/potencialdisease.pdf>

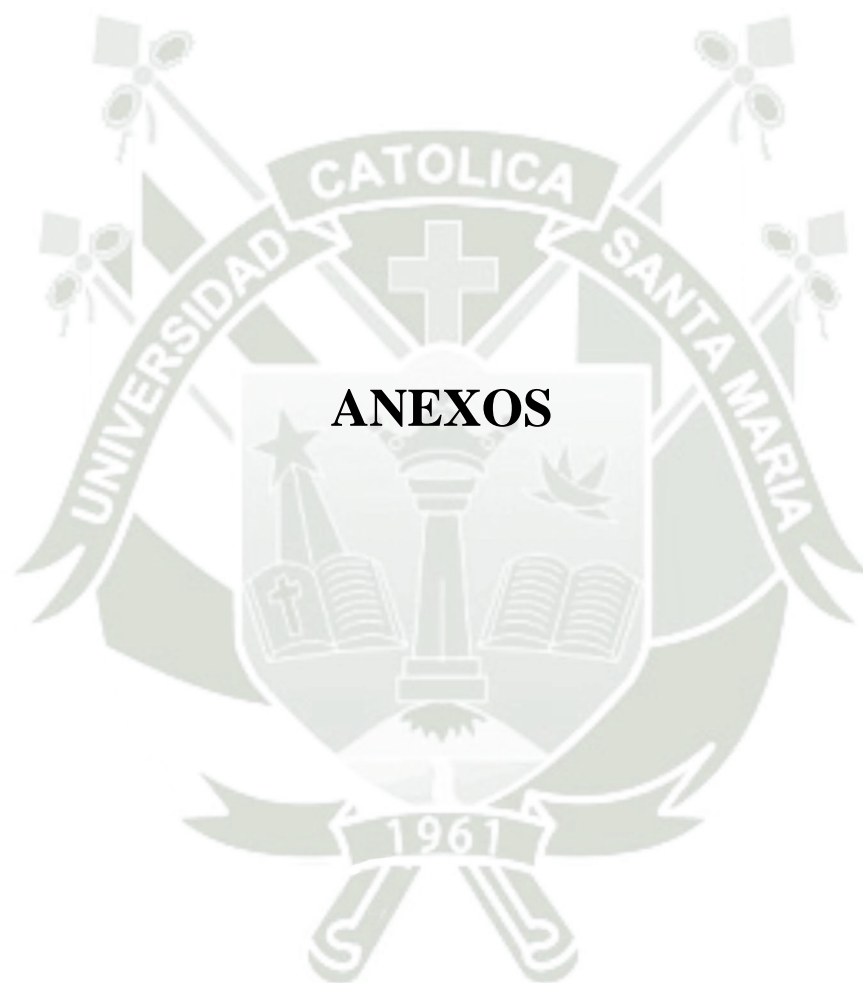
31. García Martínez EM, Fernández Segovia I, Fuentes López A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. el 22 de junio de 2015 [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>
32. Constanza L, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Nova- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas [Internet]. el 2 de diciembre de 2012 [citado el 30 de mayo de 2023];10(18):130–250. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-729486>
33. Mexicana AF, México AC, Salinas G. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [Internet]. 2006 [citado el 30 de mayo de 2023];37:69–73. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937409>
34. Vázquez-Ovando A, Mejía-Reyes JD, García-Cabrera KE, Velázquez-Ovalle G. Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales. el 29 de abril de 2022;9(1):9–33.
35. G-Biosciences. CUPRAC Antioxidant Capacity Assay [Internet]. Disponible en: www.GBiosciences.com
36. Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. Introduccion a la HPLC, Aplicacion y Practica [Internet]. 1992. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/315771927>
37. Suarez Ospina D, Morales Hernández Y. Principios básicos de la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Revista Semilleros: Formación Investigativa [Internet]. el 7 de septiembre de 2018 [citado el 31 de mayo de 2023];4. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
38. Sagar Aryal. Microbe Notes. 2023 [citado el 31 de mayo de 2023]. HPLC- Definition,Principle,Parts,Types,Uses,Diagram. Disponible en: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
39. Fiorelia NE, Dharma Wibowo A, Lae NL, Ang A, Krisbianto O. Types of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Columns: a Review. Jurnal Teknologi Pangan [Internet]. 2022 [citado el 30 de mayo de 2023];5(1):1–16. Disponible en: <https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jft/article/view/57334>

40. K. Mayolo-Deloisa, L.M. Martínez, M. Rito-Palomares. Técnicas Cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. 2012; Disponible en: www.rmiq.org
41. Morillas P, y Colaboradores. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados [Internet]. Guia Eurachem. 2016 [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: www.eurachem.org
42. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M, et al. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Instituto de Salud Pública. Santiago; 2010.
43. Yordana chacón Ortiz C, Llanina Mori Culqui P, Grimaldo Chavez Quintana S, Breve A. Antioxidantes y polifenoles totales de chocolate negro con incorporación de cacao (*Theobroma cacao* L.) crudo. Revista de Investigaciones Altoandinas [Internet]. el 16 de noviembre de 2021 [citado el 30 de mayo de 2023];23(4):266–73. Disponible en: <https://huajsapata.unap.edu.pe/index.php/ria/article/view/331>
44. Diaz A. Estudio del valor nutricional de un nuevo producto elaborado a fase de fruta deshidrada y chocolate [Internet]. [Zaragoza]: Universidad Zaragoza; 2014 [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/30692/files/TAZ-TFG-2015-102.pdf>
45. Content of total polyphenols in tea —Colorimetric method using Folin- Ciocalteu reagent [Internet]. ISO 14502-1. 2005 [citado el 31 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/31356.html>
46. Poliński S, Kowalska S, Topka P, Szydłowska-Czerniak A. Physicochemical, antioxidant, microstructural properties and bioaccessibility of dark chocolate with plant extracts. *Molecules* [Internet]. el 1 de septiembre de 2021 [citado el 31 de mayo de 2023];26(18). Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/18/5523>
47. Tokusoglu Ö, Ünal MK. Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. *European Food Research and Technology* [Internet]. octubre de 2002 [citado el 31 de mayo de 2023];215(4):340–6. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-002-0565-3>

48. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* [Internet]. mayo de 2003 [citado el 31 de mayo de 2023];81(2):249–55. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814602004193>
49. Azizah AH, Ruslawati NMN, Swee Tee T. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry* [Internet]. febrero de 1998 [citado el 31 de mayo de 2023];64(2). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814698001216>
50. Calixto-Cotos MR, Chire-Fajardo GC, Orihuela-Rivera CA. Antioxidants properties of chocolates sold in Peru. *Acta Agron* [Internet]. 2018 [citado el 31 de mayo de 2023];67(4):479–85. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122018000400479
51. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. el 1 de julio de 2000;33(6):423–47.
52. Belščak A, Komes D, Horžić D, Ganić KK, Karlović D. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*. el 1 de junio de 2009;42(5–6):707–16.
53. Cerit İ, Demirkol O, Avcı A, Arkan BS. Phenolic content and oxidative stability of chocolates produced with roasted and unroasted cocoa beans. *Food Science and Technology International*. 2023;
54. Kurtlar T. Changes in antioxidant capacity of chocolate added with almonds [Internet]. [Istanbul]: Istanbul Technical University; 2011 [citado el 31 de mayo de 2023]. Disponible en: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=vgvrMvj_MEkRL2A4VtAYPg&no=sJ0Uwty6dFcbvJOpI8Arsw
55. Official Methods of Analysis AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. 2012.
56. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular [Internet]. [citado el 30 de mayo de 2023]. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000200007

57. Santos IA, Batista AS, Conceição DG, Porfírio MCP, Santos LS, Ferrão SPB. Determining the Authenticity of Cocoa Solid in Chocolates Using Chemical Markers, Antioxidant Activity, and Multivariate Analysis. *Food Anal Methods* [Internet]. el 1 de septiembre de 2022 [citado el 30 de mayo de 2023];15(9):2558–65. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-022-02316-0>
58. Gottumukkala RVSS, Nadimpalli N, Sukala K, Subbaraju G V. Determination of Catechin and Epicatechin Content in Chocolates by High-Performance Liquid Chromatography. 2014 [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/628196>
59. Nascimento MM, Santos HM, Coutinho JP, Lôbo IP, Da Silva Junior ALS, Santos AG, et al. Optimization of chromatographic separation and classification of artisanal and fine chocolate based on its bioactive compound content through multivariate statistical techniques. 2019 [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104342>
60. Lambert JP. Nutrition and Health Aspects of Chocolate. En: *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*. Wiley-Blackwell; 2017. p. 623–35.
61. Ioannone F, Di Mattia CD, De Gregorio M, Sergi M, Serafini M, Sacchetti G. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chem* [Internet]. el 1 de mayo de 2015 [citado el 30 de mayo de 2023];174:256–62. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25529678/>
62. Lalinde H, Diego J, Castro E, Rangel C, Gerardo J, Sierra T, et al. Sobre el uso adecuado del coeficiente de correlación de Pearson: definición, propiedades y suposiciones. 2018 [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?>
63. Nara Batista N, Pereira De Andrade D, Ramos L, Dias R, Freitas Schwan R. Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. 2016 [citado el 30 de mayo de 2023]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.028>
64. Tomas-Barberán FA, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, Muguerza B, Gil-Izquierdo A, Cerdá B, et al. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem* [Internet]. el 16 de mayo de 2007 [citado el 12 de julio de 2023];55(10):3926–35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17439235/>

65. Jalil AMM, Ismail A. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules* [Internet]. septiembre de 2008 [citado el 12 de julio de 2023];13(9):2190. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6245372/](#)
66. Niemenak N, Rohsius C, Elwers S, Omokolo Ndoumou D, Lieberei R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*. el 1 de septiembre de 2006;19(6–7):612–9.
67. Hii C, Law C, Suzannah S, Cloke M, Baru Bangi B, Darul Ehsan S. Asian Journal of Food and Agro-Industry Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *As J Food Ag-Ind* [Internet]. 2009 [citado el 12 de julio de 2023];2(04):702–22. Disponible en: [www.ajofai.info](#)
68. Pascual V, Valls RM, Solà R. Cacao y chocolate: ¿un placer cardiosaludable? *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* [Internet]. el 1 de agosto de 2009 [citado el 12 de julio de 2023];21(4):198–209. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-cacao-chocolate-un-placer-cardiosaludable-S0214916809720479>
69. Valenzuela B. A. El chocolate, un placer saludable. *Revista Chilena de Nutrición* [Internet]. 2007 [citado el 12 de julio de 2023];34(3):0. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46934302>



Anexo 1: Certificado de Análisis del reactivo de Folin-Ciocalteu



Certificate of Analysis

1.09001.0500 Folin-Ciocalteu's phenol reagent
Batch HC85556101

Batch Values

Equivalent acid	c(H ⁺) = 2 mol/l (2N)
Sensitivity (to phenol)	conforms
Sensitivity (to bovine serum albumin)	conforms

Date of release (DD.MM.YYYY) 15.05.2018
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.04. 2024

Peter Unglaube
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Anexo 2: Certificado de Análisis del reactivo Trolox

Calbiochem®



Certificate of Analysis

Trolox	
Batch Number:	D00149004
Material Number:	648471-500MG
Molecular Formula:	C ₁₄ H ₁₈ O ₄
RTECS Number:	DJ2273000
CAS Number:	53188-07-1

Analytical Data		
Test	Tolerance	Result
Solubility:		Ethanol (150 mg/ml) or methanol; slightly soluble in H ₂ O (0.5 mg/ml)
Color:		Off-white
Form:		Solid
Solubility (150 mg/ml EtOH; MeOH; or 0.5:		In ethanol
Purity by HPLC:	≥98.0 %	98.1 %
NMR:		Conforms
Mass Spectrophotometry (MS):		Conforms
Carbon:	66.70 % - 67.70 %	67.21 %
Hydrogen:	6.75 % - 7.75 %	7.05 %
Batch Molecular Weight:		250.29 g/mol

Storage and Handling:	+2°C to +8°C
------------------------------	--------------

Dan Kiser, Site Head of Quality, San Diego,
Temecula, and Ramona

15-Jul-2017

Date

Prices and availability are subject to change. ©Copyright 2013 EMD Chemicals Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Each product is sold with a limited warranty, which is provided with each purchase. Each product is intended to be used for research purposes only. It is not to be used for drug or diagnostic purposes, nor is it intended for human use. EMD Chemicals products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without written approval of EMD Chemicals.

EMD Millipore Corporation | 10394 Pacific Center Court San Diego, CA 92121 USA

Anexo 3: Certificado de Análisis del reactivo Neocuproína

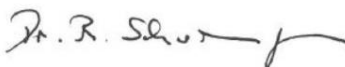
SIGMA-ALDRICH®

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: NEOCUPROINE
>= 98 %
Product Number: N1501
Batch Number: BCCB2134
Brand: Aldrich
CAS Number: 484-11-7
Formula: C₁₄H₁₂N₂
Formula Weight: 208.26
Quality Release Date: 12 MAR 2019

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO BEIGE	BEIGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	≥ 98 %	98 %
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS TO LIGHT YELLOW	LIGHT YELLOW
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR	CLEAR
SOLUBILITY (METHOD)	50 MG/ML IN METHANOL	50 MG/ML IN METHANOL
WATER	≤ 5 %	1.3 %
CARBON CONTENT	78.7 - 82.8 % (ANHYDROUS)	80.8 %
NITROGEN CONTENT	13.1 - 13.8 % (ANHYDROUS)	13.6 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
MISCELLANEOUS TESTS	SUITABLE FOR USE IN COPPER DETERMINATION	CORRESPONDS



Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Anexo 4: Certificado de Análisis del estándar de (+)-catequina

Certificado de Análisis

Nombre del producto:	(+)-Catechin hydrate
Descripción del producto:	≥98% (HPLC), powder
Marca de producto:	Sigma-Aldrich
Referencia del producto:	C1251
Peso molecular:	290.27 (anhydrous basis)
Número de CAS:	225937-10-0

ENSAYO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS PARA EL LOTE 036K1604
APPEARANCE	OFF-WHITE TO YELLOW POWDER WITH A GRAY TO YELLOW POWDER WITH TAN CAST TAN CAST	
SOLUBILITY	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY YELLOW TO AMBER SOLUTION AT 50MG/ML IN ETHANOL	CLEAR AMBER
PROTON NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONFORMS
WATER CONTENT BY NMR	REPORT RESULT	1.3%
SPECIFIC ROTATION	REPORT RESULT	+24 DEG (C=1 IN WATER AT 20 DEG CELSIUS)
PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY	MINIMUM 98%	99%
RECOMMENDED RETEST	4 YEARS	JUNE 2019
QC RELEASE DATE		JUNE 2023



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St Louis, Missouri USA

Anexo 5: Certificado de Análisis del estándar de (-)-epicatequina

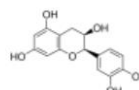
Sigma-Aldrich.

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

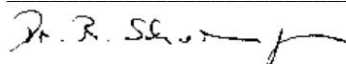
Certificate of Analysis

Product Name:
(-)-Epicatechin - ≥90% (HPLC)

Product Number: E1753
Batch Number: BCCD3979
Brand: SIGMA
CAS Number: 490-46-0
Formula: C₁₅H₁₄O₆
Formula Weight: 290,27 g/mol
Quality Release Date: 10 JUN 2020
Date Retested: 17 JAN 2022
Recommended Retest Date: JAN 2024



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Yellow and Faint Beige to Beige and Faint Brown to Brown	Faint Beige
Appearance (Form)	Powder	Powder
Purity (HPLC)	≥ 90 %	97 %
Specific Rotation (20/D) Report Result c= 1 in Acetone:Water (1:1)		-55.5 deg
Solubility (Color)	Colorless to Yellow	Faint Yellow
Solubility (Turbidity) 10 mg/ml in Acetone:Water (1:1)	Clear	Clear
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms



Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland CH

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



Version Number: 1

Page 1 of 1

Anexo 6: Certificado de Análisis de la columna para HPLC



Certificate of Analysis

1.50943.0001 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 125-4
HPLC cartridge

Batch HX251426

	Spec. Values		Batch Values	
Pressure	≤ 55.0	bar	33.0	bar
Theoretical Plates (N/m) (Toluene)	≥ 50000		84918	
Symmetry (Toluene)	0.8 - 1.4		1.0	
Capacity factor (Toluene)	1.0 - 2.5		1.7	
Raw material			HX128137	

Date of release (DD.MM.YYYY): 26.06.2014

Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 30.06.2024

Dr. Reiner Vogt

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature