

Martha Beatriz Ramírez González<sup>1</sup>; Víctor Hugo Cely Niño<sup>2</sup>; Sandra Isabel Ramírez<sup>3</sup>

### Resumen

**Objetivo:** determinar la capacidad antioxidante y contenido de grasa de clones de cacao, provenientes de especies nativas del Estado de Chiapas, México. **Materiales y métodos:** en extractos de 34 muestras semillas de cacao diluidas en metanol al 95% y clasificadas según pH en tres grupos: I (5,52-5,90), II (5,91- 6,28) y III (6,29-6,67), se realizaron ensayos analíticos de variables físicas y químicas. Se evaluó la inhibición de radicales 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) a 517 nm, el contenido de polifenoles mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) a 765 nm y cantidad de grasas totales según método AOAC. Se aplicó un ANOVA al nivel del 95%, con post prueba Tukey para comparar de medias muestrales y determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), además de sus correlaciones lineales. **Resultados:** el Grupo I con menor pH, mostró menor contenido calórico (26,3±3,6% de grasas), posee la mejor actividad antioxidante con menor valor  $EC_{50}$  de 4182 ppm y mayor contenido de polifenoles 6,6±0,32 equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra seca. **Conclusión:** el cacao chiapaneco posee importantes ventajas competitivas en el mercado, por su calidad como alimento funcional-nutracéutico y como materia prima para la industria alimentaria, fuente de antioxidantes y aditivos naturales, con potencial consumo en la industria farmacéutica y cosmética internacional.

**Palabras clave:** antioxidantes, polifenoles, concentración 50 inhibidora, barredores de radicales libres, *Theobroma cacao L.*

1 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Escuela de Ciencias Químicas. Tunja-Colombia. marberami@yahoo.com.

2 Grupo de Investigación en Ecoeficiencia, Innovación y Tecnología. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Escuela de Ciencias Químicas. Tunja-Colombia.

3 Laboratorio de Biotecnología. Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas. Chiapas-México

Como citar este artículo: Ramírez MB, Cely VH, Ramírez SI. Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao L.*) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México. *Perspect Nutr Humana*. 2013;15: 27-40.

## Antioxidant activity of clones of cocoa (*Theobroma cacao L.*) fine and aromatic grown in the state of Chiapas-México

### Abstract

**Objective:** To determine antioxidant capacity and fat content of cacao clones from the State of Chiapas, Mexico. **Materials and Methods:** 34 cocoa beans samples were diluted in 95% methanol and classified by pH in: group I (5.52-5.90), group II (5.91-6.28), and group III (6.29-6.67). Chemical and physical analysis were developed. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) inhibition was evaluated at 517 nm. Polyphenol and fat contents were evaluated by Folin-Ciocalteu Reagent at 765 nm and AOAC method, respectively. Differences in variables were evaluated by ANOVA and Tukey test, in addition to its linear correlations. **Results:** Group I showed the lowest caloric content ( $26.3 \pm 3.6\%$  fat), the best antioxidant activity with lower  $EC_{50}$  value of 4182 ppm and the highest polyphenol content ( $6.6 \pm 0.3$  gallic acid/100 g dry sample). **Conclusion:** Chiapas cocoa has significant competitive advantages due to its quality as a functional and nutraceutical food. It is a good raw material for food industry because it is a good source of antioxidants and natural additives. Furthermore, it is a potential ingredient in the international pharmaceutical and cosmetic industry.

**Key words:** antioxidant, polyphenols, inhibitory concentration 50, free radical scavengers, *Theobroma cacao L.*

### INTRODUCCIÓN

De acuerdo con estudios epidemiológicos realizados los alimentos de origen vegetal, en especial las frutas, vegetales, nueces, semillas, té, vino tinto y jugos presentes en la dieta, pueden ejercer un efecto protector contra algunas enfermedades como el cáncer y los trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares. Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, como las vitaminas C, E,  $\beta$ -caroteno, y una mezcla compleja de compuestos fenólicos. Los polifenoles son sustancias provenientes del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal. Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno. Ellos se relacionan directamente con algunas características de los

alimentos, como son el sabor, color, la palatabilidad y el valor nutricional. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos como el ácido cumárico, la quercetina y los taninos; flavonoides como las procianidinas, antocianinas, aunque el más activo biológicamente es la epicatequina; además de las flavononas y flavonol glicosídicos. Estos fenoles con peso molecular relativamente alto tienen poder antioxidante veinte veces más fuertes que la vitamina E (1).

Desde la perspectiva de salud humana, la actividad antioxidante produce beneficios, en aquellos alimentos y bebidas ricas en polifenoles, porque protegen el organismo de los radicales libres, moléculas altamente reactivas causantes de daños en el organismo a nivel celular que tienden a incrementar el riesgo al desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y algunas degene-

rativas. Los antioxidantes desactivan los radicales libres, minimiza el daño y protegen al organismo de este tipo de enfermedades, su presencia en un alimento aporta características de alimento funcional que, además de cumplir su misión nutricional, actúa como agente quimiopreventivo promoviendo efectos fisiológicos para retardar la propagación del cáncer (1).

El cultivo de cacao es uno de los principales renglones de la economía primaria mexicana con las cualidades de cacao fino y aromático, producidos desde la época colonial en el sur de México, Centroamérica y el norte de Suramérica, con variedades criollas originadas a partir de mutaciones. Se reprodujeron con características recesivas, homocigóticas de calidad y con un alto potencial aromático en sus almendras, cuyo origen común y bondades sensoriales han determinado su prestigio por la calidad final del grano de cacao producido, promisorio por su potencialidad como alimento funcional y nutracéutico, proyectando su cultivo, procesamiento y comercio a nivel nacional e internacional. El Estado de Chiapas pretende identificar y reconocer especies promisorias, mediante selección participativa, en el norte y centro de Chiapas, en especial en Tecpatán, municipio ubicado a 80 km al norte de Tuxtla Gutiérrez.

En el 2002 el área cultivada de cacao fue de 83.174 hectáreas con una producción de 46.194 toneladas de cacao seco, mientras que en el 2008, apenas se produjeron 27.549 toneladas y se reportó una superficie total cultivada de 61.092 hectáreas. Según estimaciones de la FAO la producción mexicana de cacao decrece a una tasa promedio mínima del 0,5% anual (3), debido a la práctica cultural de mezclar diferentes variedades, en detrimento de su calidad y posicionamiento. El enfoque tecnológico en Chiapas se sustenta en el cultivo de clones productivos de alta calidad, propagados por métodos vegetativos, aunque no todos los clones son resisten-

tes a la moniliasis, el manejo agroecológico de esta enfermedad ha permitido alcanzar un rendimiento de una tonelada de cacao seco/ha cultivada (4). En 2011, los dos principales estados productores, Tabasco y Chiapas, tenían unas 81.600 ha cultivadas, con casi 40.000 toneladas de grano cosechado, siendo la característica de cacao fino el factor que ubica a México en lugar preponderante sobre los grandes productores mundiales, requiriendo apropiar tecnologías para aprovechar las oportunidades del sector, tales como la aceleración de su proceso de modernización en un contexto de sostenibilidad. El Estado de Chiapas estableció cinco ejes rectores que orientan su desarrollo rural, relacionados con la producción agroindustrial y sustentable, incluyendo el subprograma de investigación agronómica y fitoquímica con transferencia de tecnología, mediante trabajo sinérgico entre la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH) y la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) (5).

El ensayo de inhibición sobre el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), para determinar la capacidad antioxidante en frutas, vegetales, plantas medicinales, cacao, alimentos naturales y procesados, se ha utilizado en forma cruzada para los mismos alimentos usando la prueba del reactivo folin-ciocalteu que mide la cantidad de polifenoles totales, dado que complementando ambos ensayos se han alcanzado resultados confiables y similares con los obtenidos por diferentes métodos (6-8).

La presencia de 39 compuestos volátiles y no volátiles producidos durante los procesos de secado y fermentación del grano de cacao son indicativos de su calidad, puesto que determinan sus características organolépticas y son los responsables de los cambios de pH. Jinap y colaboradores (9), demostraron que un pH bajo (rango 4,8-5,2) indica que los granos de cacao secos y fermentados son de inferior calidad aromática; en tanto que Portillo y colaboradores (10), encontraron que el pH aso-

## Actividad antioxidante de cacao

ciado con la disminución del potencial aromático del grano es inferior a 4,5. La variación en el nivel del pH es un parámetro determinante y relacionado con las condiciones del secado (11-12).

De otro lado, la selección de clones de cacao, especies finas y aromáticas en el Estado de Chiapas, fortalecerá la política de inversión gubernamental en cosecha, post-cosecha y en procesos de transformación ecoeficiente, que garantice las oportunidades del mercado, dado el gran interés de las industrias alimentarias y los consumidores por los alimentos funcionales, los hábitos saludables y la ingesta de productos naturales.

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante, el contenido de polifenoles totales y cantidad de grasa, en tres grupos de clones de cacao provenientes de 34 especies vegetales nativas del Estado de Chiapas, clasificadas según el pH obtenido durante el secado y fermentación del grano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de los clones de cacao

Se aplicó la metodología de selección participativa de árboles con calidad intrínseca aparente, realizada en plantaciones de cacao en las regiones de Soconusco, Norte, Selva y Centro, incluyendo algunos cultivos del municipio de Tecpatán, en la cuenca del Alto Grijalva, administrados por la Sociedad de Producción Rural Cacao Tecpateco. Los criterios incluyentes para la selección de clones de cacao fueron: identificación taxonómica y estado de crecimiento, características agronómicas de alto rendimiento, índice en número de mazorcas por kg y el índice de semilla medido como peso seco individual por semilla de cacao (13). Se recolectaron diferentes lotes de 500 g de almendras de cacao, de las mazorcas tomadas de la base del tallo, las cuales se codificaron y enumeraron desde la 101 hasta la 162, co-

rrespondientes a la micro-localización de los sectores geográficos de origen, seleccionados mediante un diseño completamente aleatorizado con arreglo unifactorial. Las almendras frescas fueron recolectadas en el mismo día de cosecha y sometidas a las prácticas de beneficio, fermentación en canastillas por 72 horas y secado al sol. Una vez secas las semillas, se realizó molienda manual hasta obtener la pasta con tamaño de partícula homogénea y se empacaron en bolsas plásticas independientes, etiquetadas con su respectivo código y transportadas hasta Colombia en una caja metálica, conservando los protocolos de la cadena de custodia para el tejido vegetal.

### Preparación de los extractos

Para el desarrollo experimental, el material vegetal seleccionado en Chiapas se codificó en la UPTC, se clasificó en 34 muestras, se sometió a un proceso de secado a 40°C en un horno con corriente de aire y se adecuaron las condiciones de laboratorio (12).

Para el ensayo del DPPH, una masa de 50 g de muestra seca y molida se extrajo con 100 mL de metanol por el método de percolación. El extracto obtenido fue concentrado hasta sequedad en un evaporador rotatorio Buchi 200/205, a una temperatura de 40°C y presión reducida. Las muestras concentradas fueron empacadas en láminas de polietileno calibre 200, color oscuro para mitigar los efectos fotoquímicos y su probable desactivación química, fueron almacenadas a una temperatura de 4°C, hasta los ensayos analíticos para la determinación de antioxidantes (13).

Para el caso de los extractos acuosos, 50 g de muestra de cacao seco y molido se sometió a reflujo con 10 volúmenes de agua a ebullición, durante 30 minutos, se filtró con vacío y luego fueron concentrados en forma análoga a los metanólicos (14-15). El extracto acuoso condensado fue liofilizado y almacenado en oscuridad a 4°C.

Para la determinación de los polifenoles totales, las muestras homogenizadas se desengrasaron con éter de petróleo y se extrajeron usando metanol/agua (80:20). Los extractos obtenidos se almacenaron en oscuridad a 4°C.

### **Determinación del pH**

El pH del extracto metanólico filtrado se midió en un equipo Oakton 2500, provisto con un electrodo de vidrio que se insertó en una alícuota de 25 mL para realizar la lectura. En este trabajo, el término acidez se refiere a la escala universal ácido-base del pH.

### **Clasificación de muestras por grupo de clones de cacao**

Los criterios aplicados para la clasificación están relacionados con los rangos de pH, por la concentración de los ácidos acético, propiónico, isobutírico e isovalérico (16), afectados por temperaturas superiores a 60°C (17-18). Las condiciones usadas para este procesamiento fueron: presión atmosférica y temperatura de 40°C. Con base en los criterios de calidad del grano en función del pH alcanzado en su procesamiento (9-10), las muestras se agruparon según el grado de acidez de los extractos metanólicos, así: grupo I con pH 5,5-5,9; grupo II con pH 5,9-6,3 y grupo III en el rango pH 6,3-6,7.

### **Determinación de actividad antioxidante sobre el radical DPPH**

El DPPH es un radical orgánico estable del nitrógeno y está relacionado con reacciones de peroxidación lipídica. Este ensayo se basa en la medida de la habilidad reductora del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en 2,2-difenil-1-picrilhidracina, por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos -OH que decoloran el reactivo DPPH; éste efecto se evalúa por el decrecimiento de la absorbancia a 517 nm, después de reaccionar con los compuestos ensayados (19). El método fue estandarizado y validado a condiciones de laboratorio,

realizando una curva de calibración, preparando soluciones de referencia o control con ácido ascórbico en concentraciones diluidas al 12,5%, 25%, 50%, además de los extremos 0% y 100%, estableciendo el rango de concentraciones entre 0-1mM. Se tomó 100µL de cada solución control y se disolvió respectivamente en 5 mL de solución acuosa y metanólica del radical DPPH al  $1 \times 10^{-4}$  M, con previa agitación vigorosa incubándose en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-21); se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, empleando un espectrofotómetro UV Genesys 10UV Thermo Electron, el disolvente solo actuó como un blanco y el ácido ascórbico como estándar. Estas determinaciones se realizaron por triplicado y para los cálculos se efectuó la respectiva transformación de coordenadas de absorbancia a porcentaje de inhibición (22), con la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ \frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \right] * 100$$

Para lograr una extracción eficiente de antioxidantes es necesario combinar el uso sucesivo de diferentes solventes. Debido a la actividad de atrapamiento de radicales DPPH se ve influenciada por la polaridad del medio de reacción, la estructura química del eliminador de radicales y el pH de la mezcla (extracto), el solvente óptimo para determinar la capacidad de atrapamiento en cacao, frutas, hortalizas, vegetales y vinos, es el metanol en soluciones acuosas superiores al 80% y el grado analítico (23-24). Se ensayaron extractos acuosos y metanólicos (95%), siendo éstos quienes presentaron la mayor capacidad de atrapamiento, por tanto se usaron para determinaciones analíticas.

### **Determinación de polifenoles totales**

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para eliminar los

## Actividad antioxidante de cacao

radicales libres (25). La estructura de los compuestos fenólicos es determinante en la eliminación de radicales y la actividad quelante de metales, denominada relaciones estructura-actividad (SAR) (26).

Para la determinación de polifenoles totales se mezcló una alícuota de 50  $\mu$ L de extracto y 1,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (dilución 1:10) y después de 5 minutos se adicionaron 1,5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7,5% con agitación continua, se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se usó ácido gálico como patrón de referencia para realizar la curva de calibración con diluciones entre 0,2-1,8 mg/mL, determinando la concentración de ácido gálico asociada a una absorbancia a 765 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra en base seca (EÁG g/100 g) (27).

### Determinación de grasas totales

El contenido de grasas en el grano del cacao es un factor determinante para cuantificar el contenido calórico y es factor decisivo en el patrón cultural del consumidor, por lo tanto se determinó mediante el Método Oficial de la AOAC 963.15 (28), a las 34 muestras de semillas de cacao homogeneizadas y deshidratadas, usando éter de petróleo como solvente para la extracción.

### Análisis estadístico

Se aplicó el test de normalidad K-S para verificar que los datos estuvieran normalmente distribuidos y posteriormente se realizó el análisis de varianza con la prueba pos-test de Tukey usando una confiabilidad del 95% para cada comparación entre tres grupos de clones, en los dos tipos de extractos ensayados del porcentaje de inhibición del DPPH (% AA). El porcentaje de inhibición se determinó para cada grupo de muestras solo en extracto metanólico grado analítico y con éstos, se obtuvo el respectivo modelo lineal I, II, III, estimando la abscisa a

la cual se alcanza un 50% de inhibición del DPPH, es decir, la concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ ). Se calcularon los valores a, b y el coeficiente de determinación  $R^2$  para cada modelo.

Los ensayos para determinación del contenido total de polifenoles se hicieron por triplicado y los resultados se reportaron como la media de cada grupo de muestras  $\pm$  error estándar, en equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra seca.

Para los resultados de porcentaje de polifenoles y grasas, el tratamiento estadístico aplicado fue similar al de la actividad antioxidante y  $\text{EC}_{50}$ .

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida simétrica que no implica causalidad, razón por la cual se usó para medir la asociación entre las variables de respuesta, el contenido de polifenoles totales y la concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ ) obtenida por el método DPPH.

El análisis se realizó usando el software estadístico SPSS® versión 19 para Windows.

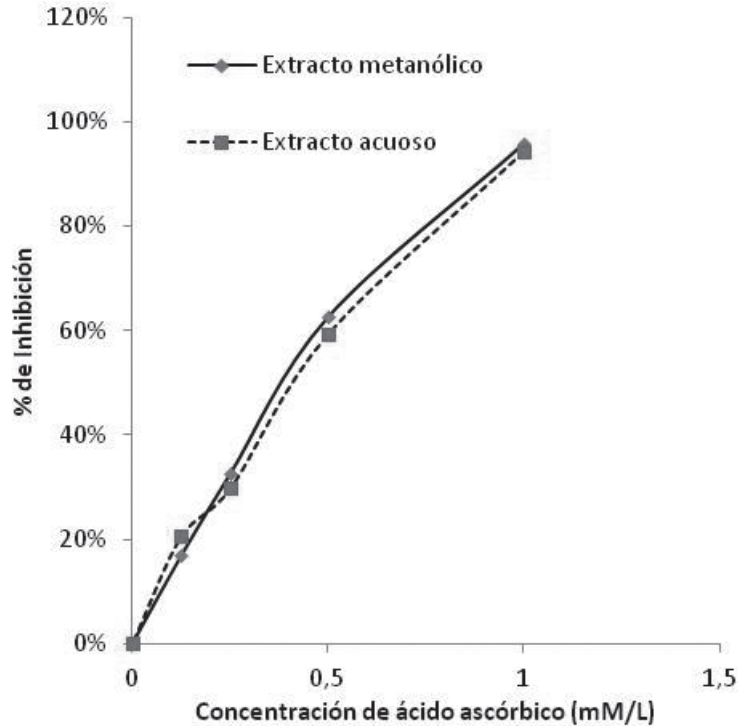
## RESULTADOS

### Actividad antioxidante del DPPH

La figura 1 describe las curvas de comparación (calibración), se reportan en porcentajes de inhibición del radical DPPH por el ácido ascórbico (1mM), para cada grupo de muestras, en agua y en metanol. Estadísticamente se demostró que existe un mayor atrapamiento cuando el extracto es metanólico.

Se presentaron diferencias significativas entre el grupo I con los grupos de extractos metanólicos II y III (Figura 1).

La tabla 1 presenta la actividad antioxidante de los 34 extractos metanólicos de cacao, clasifica-



**Figura 1.** Curva de calibración: % inhibición de ácido ascórbico en diferente disolvente

Los valores corresponden a media  $\pm$  desviación estándar (n = 3). El ácido ascórbico se usó como control

dos por rangos de acidez: alta, media y baja, la cual osciló entre 57% y 71,1% de inhibición para las muestras que poseen una concentración de 6.000 ppm. También se destaca que la mayor inhibición la mostró el grupo I de mayor acidez, a la misma concentración de 6000 ppm.

Se graficó la actividad antioxidante (% de inhibición) obtenida de los extractos metanólicos de cacao en los tres grupos de muestras (según pH) versus el control, a diferentes concentraciones: 2.500, 4.000, 5.000 y 6.000 ppm. El grupo I de mayor acidez y menor aporte calórico fue el de mayor porcentaje de atrapamiento de radicales DPPH (Figura 2).

### Correlaciones de actividad antioxidante

La tabla 2 presenta las correlaciones lineales entre porcentaje de inhibición y concentración de los grupos de muestras (extractos metanólicos) en ppm, en donde los coeficientes de determinación fueron mayores de 96% para cada uno de los grupos de muestras, lo cual asegura un buen ajuste de los datos a los modelos obtenidos. Los valores obtenidos de  $EC_{50}$  fueron: 4.182 ppm para el grupo I, 4.551 ppm para el grupo II y 4.891 ppm para el grupo III, mientras que, para la muestra de control (vitamina C-ácido ascórbico) fue 3.985 ppm. Se probó que hubo diferencias significativas entre los valores  $EC_{50}$  obtenidos de las muestras metanólicas del grupo I y las demás.

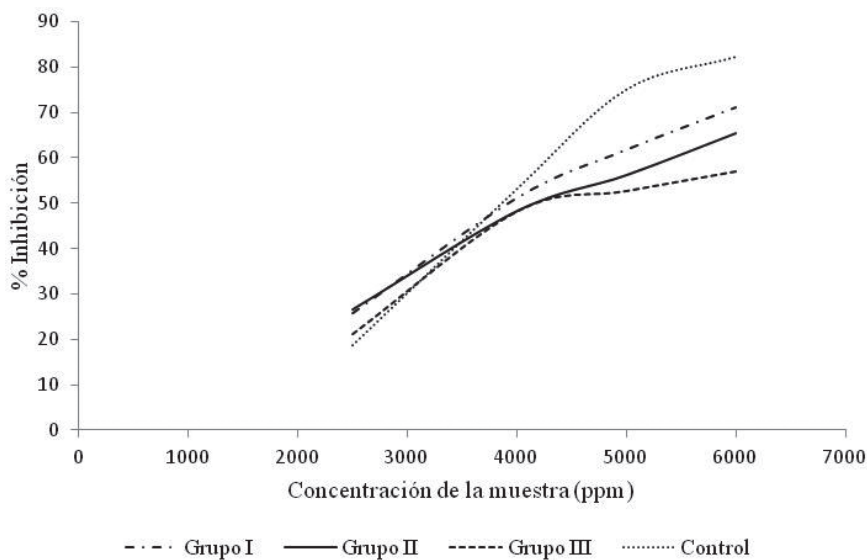
## Actividad antioxidante de cacao

**Tabla 1.** Porcentajes de inhibición del DPPH en extractos metanólicos de cacao en tres grupos de muestras según pH vs control, a diferentes concentraciones de los extractos

Grupo de muestras	Código de las muestras	Pr %	pH		Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de los extractos			
			Rango	Tipo	2500 ppm	4000 ppm	5000 ppm	6000 ppm
					AA %	AA %	AA %	AA %
I	105, 106, 107, 108, 113, 113b, 133, 144, 145, 149, 162	32,3	5,52-5,90	Alta Acidez	25,9 <sup>a</sup>	51,2 <sup>a</sup>	61,8 <sup>a</sup>	71,1 <sup>a</sup>
II	101, 102, 103, 104, 109, 111, 112, 131, 132, 136, 137, 145A, 146, 148, 153, 154, 162	50	5,91- 6,28	Media Acidez	26,6 <sup>a</sup>	44,2 <sup>b</sup>	56,1 <sup>b</sup>	65,3 <sup>b</sup>
III	138, 139, 140, 151, 157, 160	17,7	6,29-6,67	Baja Acidez	21,2 <sup>b</sup>	48,2 <sup>b</sup>	52,7 <sup>b</sup>	57,0 <sup>c</sup>
Control					18,8	53,2	75,1	82,3
Valor de p*					0,028	0,027	0,019	0,017

Pr: proporción del grupo de muestras en la población; AA = actividad antioxidante en % de inhibición de cada grupo de muestras, respecto a su concentración

\*Análisis de varianza con pruebas de comparación post-test Tukey, p-valor: nivel de significancia de las muestras a la correspondiente concentración. Las medias de valores con letras diferentes dentro de la misma columna implican diferencias estadísticas a un nivel de confianza del 95%.



**Figura 2.** Porcentaje de Inhibición del DPPH en extractos metanólicos de cacao en los tres grupos de muestras según pH versus el control, a diferentes concentraciones



**Tabla 2.** Correlaciones del % de inhibición del DPPH versus concentración de los extractos, en los tres grupos de muestras

Grupo de muestras	Media del % Inhibición	C <sub>v</sub>	Modelo Lineal			EC <sub>50</sub> (ppm) Estimada
			A	B	R <sup>2</sup>	
I	52,5± 16,0	32%	-4,053	0,01292	97,7	4182 <sup>a</sup>
II	48,1± 14,6	30%	-0,835	0,01117	99,7	4551 <sup>b</sup>
III	44,8± 13,9	31%	0,4607	0,01013	88,0	4891 <sup>b</sup>
Control	57,4± 24,7	43%	-24,76	0,01876	96,5	3985 <sup>c</sup>

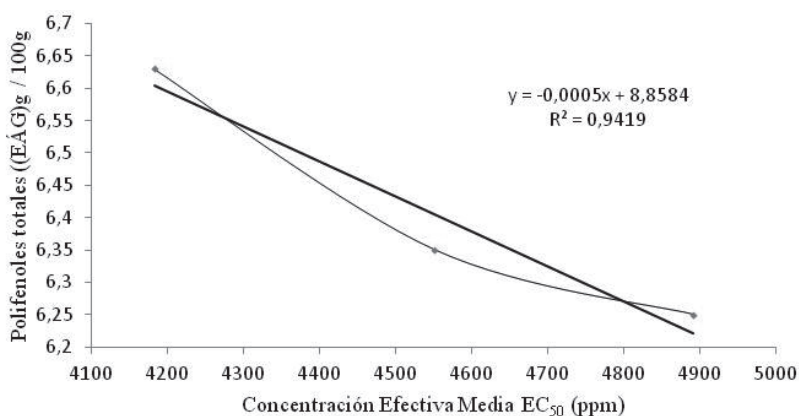
C<sub>v</sub> = Coeficiente de variabilidad, A = constante, B = beta, R<sup>2</sup> coeficiente de determinación.

EC<sub>50</sub> = concentración efectiva media. Las medias de valores con letras diferentes dentro de la misma columna implican diferencias estadísticas a un nivel de confianza del 95% según la prueba de comparación muestral post-test de Tukey.

### Contenido de polifenoles totales

El grupo I de semillas de cacao chiapaneco posee el menor valor de EC<sub>50</sub>, indicando la mejor actividad antioxidante y al mismo tiempo posee el más alto contenido de polifenoles en equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra seca. Los resultados fueron: grupo I: 6,6±0,3 (ÉAG) g/100g, grupo II: 6,4±0,2 (ÉAG) g/100g y el grupo III: 6,3±0,2 (ÉAG) g/100 g (datos no mostrados).

Existe una correlación inversa entre el contenido de polifenoles totales (EÁG g/100g) y la actividad antioxidante EC<sub>50</sub> (ppm) en el análisis conjunto del total de muestras de los tres grupos de extractos metanólicos de cacao. El coeficiente de determinación R<sup>2</sup> fue 94,2%, indicando alto grado de asociación entre los dos ensayos; por tanto, existe mayor presencia de polifenoles totales en las muestras a mayor actividad antioxidante o menor EC<sub>50</sub> (Figura 3).



**Figura 3.** Correlación contenido de polifenoles totales (EÁG g/100g) vs. actividad antioxidante medida en EC<sub>50</sub> (ppm). Cada punto en la curva, representa el grupo de muestras en extracto etanólico I, II y III.

### Contenido en grasa de clones de cacao

El porcentaje de grasas totales extraídas de los granos de cacao para cada uno de los grupos de muestras osciló entre 26,3-46,1%. El promedio obtenido fue: grupo I = 26,3±3,6%, grupo II = 37,9±5,3%, grupo III = 34,5±6,4%. A mayor acidez existe mayor contenido en grasa, siendo el promedio general en las 34 muestras el 35,1±7,1% de grasas, es decir, con desviación de 7,1% y variabilidad del 20,3% ( $p < 0,05$ ) (datos no mostrados).

### DISCUSIÓN

Para evaluar la actividad antioxidante de una muestra es necesario combinar al menos dos métodos, en este trabajo se realizó con cantidad de polifenoles totales y captación de radicales libres, usando extractos metanólicos, con el solvente analítico del 95%; dicha actividad es concomitante con el poder reductor y las propiedades reductoras están asociadas con la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno (6-8). La capacidad antioxidante en un extracto de producto natural depende de la biodisponibilidad de su mezcla específica de compuestos presentes y de las interacciones sinérgicas entre ellos, produciendo la respuesta antioxidante final en el nivel celular, mediante el mecanismo de inducción de enzimas desintoxicantes para proteger al organismo contra enfermedades, mutágenos y carcinógenos, es decir, actuando como agentes preventivos del cáncer (1).

El criterio analítico indica que, cuando la concentración efectiva media  $EC_{50}$  es menor, la capacidad antioxidante de los extractos para actuar como eliminadores de DPPH es más fuerte, por tanto representa el antioxidante total necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH radical en un 50%. Comparando los valores de

$EC_{50}$  de los grupos de extractos metanólicos, la menor fue la del grupo I con 4.182 ppm, mientras que la vitamina C (sustancia de referencia-ácido ascórbico) está por debajo de los 4.000 ppm, lo cual explica que se requiere menor concentración del extracto para inhibir el 50% del radical DPPH.

El ensayo DPPH refleja la habilidad que posee un antioxidante para donar protones en un medio metanólico y la metodología usada, permite realizar cálculos reproducibles y significativos para medir la velocidad de interacción de los antioxidantes presentes en la muestra de cacao con el radical DPPH, comparado con la vitamina C, presente en el antioxidante de referencia (ácido ascórbico), que reacciona a una alta rapidez y un elevado porcentaje de inhibición de radicales (29-30). Los extractos metanólicos produjeron una mayor actividad de atrapamiento que los acuosos y mayor contenido de polifenoles totales en los clones analizados y procesados, similar a los reportes de Sharma-Om y su grupo (23). La literatura solo reporta la actividad oxidante en  $EC_{50}$  en extractos de semillas de cacao de países con origen asiático (6), como Malaysia (2.400±100 ppm), Ghana (1.700±10 ppm), Costa de Marfil (2.900 ppm), de cuya comparación se deduce que la variedad de semilla de cacao chiapaneco posee una buena actividad, dado que su  $EC_{50}$  fue 4.182 ppm.

Los resultados obtenidos de actividad antioxidante y su correlación con la cantidad de polifenoles totales, además de corresponder a especies caracterizadas por un bajo nivel de grasas totales y de valor calórico en la dieta humana, se infiere que el consumo de cacao chiapaneco, podría tener efectos beneficiosos para la salud, similares a ciertas frutas, especies vegetales, plantas medicinales y vinos, así como posibles usos como materia prima para la obtención de antioxidantes naturales de utilidad en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

De los 34 extractos evaluados, la actividad antioxidante del cacao resultó ser más alta en los 11 clones pertenecientes al grupo con menor pH y un  $EC_{50}$  más bajo (4.182 ppm), muy cercano al de otros alimentos reconocidos como antioxidantes naturales (33), además, este grupo de clones fue el que mostró la concentración más baja de grasas totales, comparadas con el rango entre 54,6-56,1% reportada para diferentes variedades, genotipos y muestras comerciales latinoamericanas (13, 35), además de las reportadas para el cacao en polvo procesado (deshidratado-desengrasado) con 11% en grasas y aporte calórico de 272 kcal por 100 g y los granos de cacao descascarado con 54% en grasas y aporte de 925 kcal por 100 g (34); se colige que los clones de cacao chiapaneco poseen un moderado bajo nivel de grasas y con valor calórico estimado, inferior a 600 kcal por 100 g, características propias del cacao fino, que potencializará una gran demanda en el mercado internacional (35).

Existe un importante nicho para su explotación agroindustrial y como fuente de futuras investigaciones que precisen especificidades de su actividad antioxidante y permitan proponer innovaciones en la industria de alimentos a base de cacao y derivados; dado que los clones de cacao chiapaneco constituyen una buena fuente de antioxidantes, superior al contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de bebidas como el té negro, el té verde y el vino tinto, que contienen valores de polifenoles de 124 mg de EÁG/g, 165 mg de EÁG/g y 340 mg de EÁG/g, respectivamente. La capacidad antioxidante total de estas bebidas por el ensayo del DPPH tuvo una alta correlación con el contenido fenólico, con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 96,7%; similar al obtenido en la presente investigación, sugiriendo un importante beneficio para la salud, comparándolo con las bebidas mencionadas (24). Estos resultados contrastan con un trabajo

realizado en 73 vinos tintos producidos en Brasil, Chile y Argentina reconocidos como importante fuente de antioxidantes, variedades Merlot, Pinot Noir y Cabernet Sauvignon, cuya actividad antioxidante osciló entre 47,9 y 66,7% de inhibición del DPPH (33). A juzgar por la inhibición media fue de  $52,5 \pm 16\%$ , con  $EC_{50}$  de 4.182 ppm obtenido para el mejor grupo de muestras analizadas, se deduce que los clones de cacao chiapaneco poseen antioxidantes similares al vino tinto y superior al reportado para bebidas similares como el té (24).

Perea y colaboradores (36) encontraron que existe una correlación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, pero estas variables se ven afectadas por el proceso de transformación del grano, especialmente durante la etapa de tostado, en la que se presenta una pérdida de polifenoles y de actividad antioxidante alrededor del 23% con respecto a la materia prima sin tratar. Para minimizar estos efectos, el proceso de extracción y manufactura deberá ser riguroso para conservar la calidad organoléptica y la actividad antioxidante (37), especialmente cuando el tostado se realice a temperatura superior a  $120^\circ\text{C}$  en la transformación industrial. Así mismo, la formación de nuevos compuestos, entre azúcares reductores y grupos amino, de conformidad con la reacción de pardeamiento no enzimático de Maillard (38) favorece la formación de sabores y colores, que son necesarios a nivel productivo y en la formulación de nuevos productos (39).

## CONCLUSIONES

Los polifenoles totales de los extractos metanólicos, obtenidos por el ensayo de FCR, fueron superiores a los 660 EÁG g /100 g de muestra seca, mientras que el porcentaje de inhibición fue cercano al 60%, siendo el metanol analítico (95%) el mejor disolvente porque presentó mayor bioactividad que los extractos acuosos, en el proceso de extracción de

### Actividad antioxidante de cacao

compuestos con actividad antioxidante y antirradi-calaria. Los clones del grupo I poseen bajos niveles de pH y porcentaje de grasas totales, lo cual los convierte en un producto agrícola de gran interés e importante valor agregado para diferentes sectores industriales, como la industria alimentaria, potencializando las diferentes variedades nativas del *Theobroma cacao* L. como bastión para fortalecer el desarrollo agrícola y rural, y como diferenciador en innovación tecnológica de la economía chiapaneca, agroindustrial por antonomasia.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte técnico y agronómico recibido de la Universidad Autónoma de

Chiapas (UNACH) y del Laboratorio de Ecoeficiencia y Productos Naturales de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

### FINANCIACIÓN

Fundación Produce de Chiapas, Dirección General de Investigación y Postgrado de la Universidad Autónoma de Chiapas (Proyecto interno 065 de 2011) y la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Proyecto DIN 1057 de 2012).

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no estar incursos en conflictos de intereses.

## Referencias

1. Weisburger J. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. *Food Chem Toxicol.* 1999;37:943-8.
2. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130:2109S-14S.
3. Chiapas. Gobierno del Estado. Plan de Desarrollo Chiapas Solidario: 2007-2012. Tuxtla Gutiérrez; 2007. [citado enero de 2012]. Disponible en: <http://www.planeacionchiapas.gob.mx/?mod=contenido&pagina=121>
4. Ramírez SI. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. *Tecnología en Marcha.* 2008;21:97-110.
5. Universidad Autónoma de Chiapas. Plan de Desarrollo Chiapas Solidario 2007-2012. En: Programa institucional de crecimiento de la productividad agropecuaria de Chiapas: 2007-2018. Tuxtla Gutiérrez; 2007. [citado enero de 2012]. Disponible en: <http://www.unach.mx/eventos/carteles/Images/299.pdf>
6. Othman A, Ismail A, Ghani NA, Adenan I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 2007;100:1523-30.
7. Prakas A, Rigelhof F, Miller E. Antioxidant activity. *Medallion Labs.* 2001;19:75-81.
8. Kuskoki E, Asuero A, García PA. Actividad antioxidante de pigmentos asiáticos. *Cienc Tecnol Aliment.* 2004;24:691-3.
9. Jinap S, Dimick P, Hollender R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control.* 1995;6:105-10.
10. Portillo E, Graziani L, Betancourt E. Análisis químico del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el sur del lago de Maracaibo. *Rev Fac Agron (LUZ).* 2007; 24: 522-46.

11. López O, Ramírez SI. Caracterización agronómica de clones theobroma cacao, en plantaciones de cacao, en Tuxtla Chico, Tapachula, Tuzantán y Pichucalco, Estado de Chiapas. En: Memorias 2º Congreso de Investigación. Tuxtla: Universidad Autónoma de Chiapas; 2001.
12. Cely VH. Diseño de experimentos en ingeniería química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 1993.
13. Álvarez C, Pérez E, Lares MC. Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, Estado Aragua. *Agron Trop*. 2007;57:249-56.
14. Dong YJ, Yao CH. In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *LWT. Food Sci Tech*. 2008;41:669-77.
15. Hui-Yin Ch, Yuh-Charn L, Chiu-Lan H. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem*. 2007;104:1418-24.
16. Rodríguez-Campos J, Escalona-Buendía H, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores M. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao L.*) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res Int*. 2011;44:250-8.
17. Nogales J, Graziani L, Ortiz-Bertorelli L. Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera. *Agron Trop*. 2006;56: 5-20.
18. García-Alamilla P, Salgado-Cervantes MA, Barel M, Berthomieu G, Rodríguez-Jímenes GC, García-Alvarado MA. Moisture, acidity and temperatura evolution during cacao drying. *J Food Eng*. 2007;79:1159-65.
19. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 1995;28:25-30.
20. Koleva M, Van Beek T, Linssen J, Degroot A, Evstatiera L. Screening of plant extract for antioxidant activity a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal*. 2002;13:8-17.
21. Cottele N, Bernier J, Catteau J, Pommery P, Wallet J, Gaydou E. Antioxidants properties of hydroxyl-flavones. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:35-43.
22. Mensor L, Menezes F, Leitao G, Reis A. Screening of Brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*. 2001;15:127-30.
23. Sharma-Om P, Bhat-Tej K. Analytical methods DPPH antioxidant assay revisited *Food Chem*. 2009;113:1202-5.
24. Lee KW, Keem YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phitochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agr Food Chem*. 2003;51:7292-5.
25. Huang, D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53:1841-56.
26. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006;99:191-203.
27. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*. 1998;78:270-6.
28. AOAC. Official methods of analysis. Washington; 1995. vol. 2. Method 963.15 and 969.33, Supplement.
29. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufactured of chocolate methodology for identification and quantification. *Food Res Int*. 2000;33:423-7.
30. Talero YV, Nossa DL, Cely VH, Ramírez MB, Roza WE. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos polares de comfrey (*Symphytum officinale L.*), una especie promisorio del valle de Sogamoso. En: Memorias XXIX Congreso Latinoamericano de Química CLAQ. Cartagena; 2010.

### Actividad antioxidante de cacao

31. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, Mc Donald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002;127:183-98.
32. López O, Ramírez SI, Ramírez G. MB, Rozo WE, Espinosa S. Contenido y actividad antioxidante de semillas de clones de cacao obtenidos por mejoramiento participativo en Tecpatán Chiapas. En: 5° Congreso de Investigación Unach. 2012. p. 317-9.
33. Granato D, Chizuko F, Katayama U, Inar Alves de Castro I. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem*. 2011;129:366-73.
34. Food technology and food safety programmers. Composición física y química de los granos, de la manteca, de la masa y del polvo de cacao. Wageningen University 2009. [citado enero de 2012]. Disponible en: <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp48.htm>
35. Centro de Comercio Interno. Manual de productos básicos: cacao fino de aroma. Estudio de la producción y el comercio mundial. Ginebra: UNCTAD GATT; 1991.
36. Perea-Villamil J A, Cadena-Cala T, Herrera-Ardila J. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*. 2009;41:128-34.
37. Arlorio M. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans. *Food Chem*. 2007;106:967-75.
38. Deguine-Delay V, Menasche M, Schauerbeke M. Epigenetic mechanisms of aging: relations between Maillard reactions and radical generation. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1997;191:247-52.
39. Mohos-Ferenc A. Confectionery and chocolate engineering: principles and applications. New York: John Wiley & Sons; 2010.