



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE NUTRICIÓN

Capacidad Antioxidante y Polifenoles Totales del Grano de Cacao
(*Theobroma cacao L.*) de los Distritos de Naranjillo y Rioja.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN**

AUTOR:

ESPARZA DEZA ROSA MARLY

ASESOR:

Ms. Mayra Anticono Barreto

Dra. Nélide Milly Otiniano García

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Alimentación y Nutrición

TRUJILLO – PERÚ

2017

JURADO CALIFICADOR

Mg. Adrián Quispe Tacunan

PRESIDENTE

Dra. Karyn Olascuaga Castillo

SECRETARIO

Dra. Nelida Milly Otiniano García

VOCAL

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi querida madre Elvia Deza Dávila que en todo momento me apoyó, por su sacrificio y esfuerzo que me demuestra día a día y por haber confiado en mi capacidad de ser profesional hasta el día de hoy.

A mis hermanos y sobrina por haber estado conmigo en todo momento y por su apoyo moral hacia mi persona a lo largo de todo este tiempo

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a mi Dios por haberme brindado salud, sabiduría, fortaleza e iluminar mis pasos en todo momento de mi vida, por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más, sin Él no hubiera llegado hasta lo que soy ahora.

A mi asesora de tesis la Dra. Nélida Milly Otiniano Garcia, por sus enseñanzas, comprensión, su manera de trabajar y paciencia que han sido fundamentales para culminar esta investigación.

A la Ms. Mayra Anticona Barreto por haberme brindado su ayuda y conocimientos constantes.

A la Dra. Patricia Gálvez por su apoyo incondicional, por su amabilidad y buen espíritu que me brindó.

Gracias a todas las personas, compañeros y amigos que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Rosa Marly Esparza Deza con DNI N° 47230130, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas , Escuela de Nutrición, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y autentica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad Cesar Vallejo.

Trujillo, junio del 2017

Rosa Marly Esparza Deza

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada “Capacidad antioxidante y polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Licenciada en Nutrición.

La Autora

INDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD.....	v
PRESENTACIÓN.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MÉTODO.....	12
III. RESULTADOS.....	19
IV. DISCUSIÓN	24
V. CONCLUSIONES	27
VI. RECOMENDACIONES.....	28
VII.REFERENCIAS	29
ANEXOS	

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la capacidad antioxidante y polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja, se trabajó con un diseño de investigación descriptivo exploratorio. Se empleó 2 muestras de grano de cacao. La capacidad antioxidante se determinó mediante el método de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y para la determinación de polifenoles totales se aplicó el ensayo de Singleton y Rossi (F- C). Como instrumento se utilizó la ficha de recolección de datos. Se observó que la mayor capacidad antioxidante la presentaron los granos de cacao del distrito de Naranjillo con (41.83%) seguido de Rioja con (40.24%). En la determinación del contenido de polifenoles totales se observó que los granos del distrito de Naranjillo con 1870.46 ± 3.6 , contienen más polifenoles los granos de Rioja con 1224 ± 1.9 mg GAE/100g respectivamente. Los resultados muestran que la capacidad antioxidante y polifenoles totales es mayor en los granos de cacao del distrito de Naranjillo comparados con los granos del distrito de Rioja. Con un valor de p (>0.05).

Palabras clave: Antioxidante, polifenoles, *Theobroma cacao* (cacao).

ABSTRACT

The present work had as objectives to determine the antioxidant capacity and total polyphenols of the cocoa bean (*Theobroma cacao L.*) of the districts of Naranjillo and Rioja, we worked with an exploratory descriptive research design. Two samples of cocoa beans were used. The antioxidant capacity was determined by the 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) method and for the determination of total polyphenols the Singleton and Rossi (F-C) test was applied. The data collection form was used as instrument. It was observed that the highest antioxidant capacity was in the cocoa beans of the district of Naranjillo with (41.83%) followed by Rioja with (40.24%). For the determination of the total polyphenol content, it was observed that more polyphenols contain the grains of the district of Naranjillo with 1870.46 ± 3.6 , the grains of Rioja with 1224 ± 1.9 mg GAE / 100g respectively. The results show that the antioxidant capacity and total polyphenols are higher in the cocoa beans of the district of Naranjillo compared to the grains of the district of Rioja.

Key words: Antioxidant, polyphenols, *Theobroma cacao L.* (cocoa).

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Realidad Problemática

Mediante estudios realizados se ha podido demostrar que los alimentos de origen vegetal tienen efectos beneficiosos en cuanto a la prevención de enfermedades crónicas relacionadas con los radicales libres, en su mayoría con personas adultas. Este papel beneficioso va más allá de los contenidos nutritivos de los alimentos, y se relaciona a las sustancias antioxidantes naturales que se encuentran presentes en los mismos¹.

Estos resultados solo se evidencian en el organismo cuando forman parte de un hábito constante a lo largo del tiempo¹.

Según publicaciones en el 2009 por la OMS, en el año 2005 murieron 17.5 millones de personas por enfermedades cardiovasculares, que equivale al 30 % de todas las muertes registradas a nivel mundial.; esta cifra se estima aumentará conforme pasen los años².

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal, lo cual se ha demostrado que una dieta basada en estas sustancias puede disminuir la incidencia de las enfermedades cardiovasculares².

En la actualidad la demanda por alimentos saludables ha incrementado el interés por el efecto beneficioso que tiene con la reducción de sufrir enfermedades cardíacas, cancerígenas y otras enfermedades degenerativas, lo cual ha hecho que se incrementen los estudios para determinar nuevos alcances en beneficios de la salud³.

Es por eso que hoy en día las personas están tomando un interés mayor lo que ha promovido el estudio de sustancias naturales como es el caso de los polifenoles presentes en plantas y frutos ya que además estos tienen propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antitrombóticas³.

1.2 Trabajos Previos

Sotero et al⁴ en el Perú realizaron un estudio de los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.), cacahuillo (*Herrenia nitida*), copoazú (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng Schum) y macambo (*Theobroma bicolor* Humb & Bompl). Tuvieron como objetivo evaluar la capacidad antioxidante de cuatro especies comestibles de origen amazónico de diferentes frutos como: cacao, cacahuillo, copoazú y macambo, de la familia Sterculiaceae y determinar los compuestos fenólicos presentes en estos frutos. El grano de cacao lo recolectaron en el mercado de Quillabamba (Cuzco) y las muestras de cacahuillo, copoazú y macambo se cosecharon de la Estación Experimental del IIAP en la Reserva Allpahuayo- Mishana, en Iquitos. En lo que concluyen que la capacidad antioxidante presenta los siguientes IC₅₀, mg/mL: cacao: 0,52; cacahuillo: 1,69; copoazú: 2,32 y macambo: 7,55, en cuanto a mayor concentración de polifenoles presenta las semillas de cacao con 12101,46 mg/100g.

Padilla et al⁵, realizaron un estudio cuyo objetivo fue relacionar el contenido de polifenoles y actividad antioxidante en productos de origen vegetal. Los polifenoles fueron cuantificados mediante el método de folin- ciocalteau, mientras que la actividad antioxidante fue evaluada mediante el método del b- caroteno/linoleato, el poder reductor y la actividad antirradical. Los alimentos estudiados fueron las semillas y pericarpios de: *Theobroma cacao* (cacao), *Campsiandra cornosa* (chiga), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Melicoccus bijugatus* (mamón). Como conclusiones determinaron que el contenido de polifenoles se relaciona con la actividad antioxidante de los granos estudiados, siendo el cacao uno de los más altos en polifenoles mientras el mayor poder antirradical lo presento las semillas de chiga.

Chavez et al⁶, realizaron un trabajo de investigación que tuvieron como objetivos cuantificar el contenido de polifenoles totales, antocianinas y determinar la capacidad antioxidante por su capacidad de inhibir radicales libres 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) y acido 2,2-azinobis(3etilbenzotiazoline)-6-acidosulfonico (ABTS) durante el proceso del licor de cacao y polvo de cacao. Las muestras fueron molidas y desgrasadas por el método Folch. Se preparó extractos hidroalcoholicos

que se basó en pesar 10 g de cacao en 100 mL (agua/etanol 50:50v/v), macerado por 24 horas, filtrado y centrifugado a 10000 rpm/10min/4°C. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completo al azar (DCA) y el diseño de bloques completo al azar (DBCA), en las muestras donde hubo diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$), para esto utilizaron el programa SAS versión 9.0. Para analizar todas las muestras de manera conjunta utilizaron el análisis multivariado con componentes principales, utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011. Como conclusión obtuvieron que la mayor cantidad de polifenoles totales durante el procesamiento del licor de cacao y polvo de cacao fue en el grano 6,394 - 0,095 g EAG/100g y el menor fue para el grano molido 4,036-0,105 g EAG/100g. El mayor contenido de antocianinas fue en el grano 0,043 mg cianidina-3-glucosido/g y el menor fue para el grano molido 0,003 mg cianidina-3-glucosido/g. La mayor capacidad de inhibición del radical DPPH fue $IC_{50} = 0,117 \text{ } \mu\text{g/mL}$ y la mejor capacidad de inhibir del radical ABTS fue $IC_{50} = 0,054 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

Perea et al ⁷, realizaron un estudio cuyo objetivo fue estimar la cantidad de polifenoles y la capacidad antioxidante de productos derivados del cacao bajo procesamientos distintos. Como materiales y métodos las muestras fueron recogidas durante las etapas de procesamiento del chocolate amargo, chocolate de mesa con azúcar, chocolate clavos y canela y un producto similar de chocolate obtenido a partir de polvo de cacao y grasa vegetal. Para determinar el contenido de polifenoles usaron el método de Folin-Ciocalteu y DPPH para determinar la actividad antioxidante y el radical 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico-6) (ABTS). Posteriormente se midió la habilidad reductora de las muestras sobre el hierro usando el método de FRAP. Como resultados obtuvieron que todos los productos evaluados presentaron diferencias notorias en el contenido total de polifenoles y actividad antioxidante frente a las diferentes compuestos radicalarios, siendo el chocolate amargo el que presentó el mayor contenido de polifenoles y la mayor actividad antioxidante seguidas de las semillas de cacao secas y fermentadas. Como conclusión determinaron que existe una relación directa entre el contenido de

polifenoles y la actividad antioxidante, sin embargo estas variables se van alterando conforme más transformación sufra el grano especialmente durante el proceso de tostado, en la que se presenta una mayor pérdida de polifenoles y de actividad antioxidante de aproximadamente un 23% con respecto a la materia prima sin procesar.

Othman et.al⁸, Investigó la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de los granos de cacao de diferentes países, a saber, Malasia, Ghana, Costa de Marfil y Sulawesi. La capacidad antioxidante de agua y extractos etanólicos preparados a partir de granos de cacao se midió por tres ensayos diferentes. Para estimar el contenido de fenoles totales, se utilizó el ensayo utilizando reactivo de Folin-Ciocalteu. El extracto acuoso mostró el valor más alto de actividad antioxidante basado en ensayo de blanqueo b-caroteno, mientras que el extracto etanólico mostró la más alta de eliminación y la reducción de las actividades férrico. Los granos de cacao de Ghana mostraron las mayores actividades antioxidantes y eliminadores, seguido de Marfil Costa, Malasia y Sulawesian. Sin embargo, los granos de Malasia y Sulawesian exhibieron el mayor férrico reducción de la actividad, en comparación con los otros granos. El mayor contenido fenólico se encuentra en los granos de Malasia, seguido de Sulawesian, Ghana y Costa de Marfil. Existía correlación positiva tanto para etanólico ($r = 0,76$) y los extractos de agua ($r = 0,78$) entre el contenido fenólico y férrico reducción de la actividad. Sus resultados mostraron que la capacidad antioxidante y el contenido fenólico de los granos de cacao de Malasia fueron comparables a los de Ghana, Marfil Costa, y Sulawesian.

Loannone et al⁹, investigaron el efecto del tostado sobre el contenido de flavonoides y proantocianidinas y en la actividad antioxidante de los granos de cacao. Los granos de cacao se tostaron a tres temperaturas (125, 135 y 145°C), por diferentes momentos, para llegar a un contenido de humedad alrededor de 2g a 100g (-1). Quienes determinaron los flavanoles y proantocianidinas, y la actividad antioxidante fue probada por el índice de fenoles totales (TPI), férrico reducción de la potencia antioxidante (FRAP) y radical de parámetros de captura antioxidante métodos totales (TRAP). Las tasas de flavanoles y la pérdida total de proantocianidinas aumentaron de

acuerdo a las temperaturas de tostado a los que fueron sometidos los granos. Siendo el contenido de humedad de los granos tostados técnicas iguales, las altas temperaturas van a minimizar la pérdida de proantocianidinas. El contenido de humedad en igualdad de condiciones, la temperatura media de tostado (135° C) determina el más alto valor de TPI y FRAP y la temperatura más alta (145° C) determinaron los valores más bajos de TPI. El contenido de humedad en igualdad de condiciones, los procesos de tiempo de cocción a baja temperatura maximiza la actividad, como se determina por el método TRAP.

Carrillo et al ¹⁰, realizaron una investigación cuyo objetivo fue estudiar la influencia de áreas geográficas en polifenoles y metilxantinas, sus contenidos y la actividad antioxidante en los granos de cacao de diferentes zonas productoras de cacao de Colombia, y evaluar la posibilidad de establecer una clasificación basada en las áreas geográficas de las regiones productoras de cacao. Analizaron 18 plantaciones de cacao situadas en diferentes zonas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de polifenoles totales (TPC), flavanol, epicatequina, catequina, la cafeína y el contenido de teobromina, así como la relación teobromina / cafeína y la capacidad antioxidante entre algunas de las diferentes muestras empleadas, que evidencia un efecto significativo de la región productora de cacao en estos parámetros. En general, una relación proporcional se ha propuesto que existe entre el contenido de polifenoles con cambios en la altitud de cultivos de plantas, a pesar de esto, nuestros resultados sugieren que cuanto menor es la altura, más polifenoles, flavanoles y epicatequina son producidos por la planta de cacao. Los resultados del análisis del componente principal (PCA) indican que el contenido de cafeína y teobromina podrían servir como parámetros para establecer una clasificación del grano de cacao según la zona geográfica que este pertenezca.

Zapata et al¹¹, realizaron un estudio donde tuvieron como objetivo evaluar el resultado del tostado sobre la presencia de metabolitos y la actividad antioxidante en 5 muestras de cacao procedentes de la ciudad de

Colombia. Como extractos utilizaron las diferentes muestras de cacao en las cuales pudieron determinar el contenido de fenoles totales, antocianinas totales y taninos condensados, mediante métodos espectrofotométricos; así como otros metabolitos como catequina, epicatequina, teobromina y cafeína. La capacidad antioxidante lo determinó mediante el método de DPPH, y por medio de la actividad atrapadora del radical ABTS. Como resultados obtuvieron que el proceso de tostado de los 5 clones de cacao no fue uniforme sobre los cambios entre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante.

1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

1.3.1 CACAO

Un grano de cacao es la semilla fermentada y secada del (*Theobroma cacao L.*), del cual los sólidos de cacao y la manteca de cacao se sustraen. Los granos del cacao son la base del chocolate¹².

Una vaina de cacao tiene una capa rugosa y de consistencia dura que mide unos 3 centímetros (esta cambia de consistencia la cual depende del origen y la variedad de la vaina). La parte interna de la vaina está llena de pulpa dulce y mucilaginoso (más conocida como “baba de cacao” en América del Sur)¹².

Las semillas del cacao son generalmente blancas, sin embargo van cambiando de color tornándose violetas o un marrón rojizo durante el proceso de secado. Hay excepciones en algunas variedades raras de cacao blanco, en que las semillas se mantienen blancas¹².

Kalvatchev et al.¹³ El cacao tiene alrededor de 300 compuestos volátiles incluyendo esteroides, hidrocarbocinonas, monocarbonilos, piroles, etc. Se conoce que los compuestos que dan el sabor al cacao son esteroides alifáticos, polifenoles, carbonilos aromáticos insaturados, diketopiperazinas, pirazinas y teobromina. El cacao también contiene alrededor de 18% de proteínas (8% digestibles); grasas (manteca de cacao); aminas y alcaloides incluyendo teobromina (0,5 a 2,7%), cafeína (0,25 a 1,43%), tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicotínico y aminoácidos libres;

taninos, fosfolípidos, etc. La manteca de cacao contiene mayormente triglicéridos de ácidos grasos constituidos de ácidos oleico (37,3%), esteárico (34,4%), y palmítico (26,2%). Más de un 73% de los glicéridos están presentes como formas monoinsaturadas. En la manteca de cacao hay pequeñas cantidades de esteroides y metilesteroides; los esteroides están compuestos de beta-sitosteroides, estigmasterol y campesterol, con muy pequeñas cantidades de colesterol. En adición a los alcaloides (principalmente teobromina), taninos y otros constituyentes, la cáscara del cacao posee un pigmento que es un poliflavono glucósido con un peso molecular sobre los 1500, este pigmento es muy importante porque es resistente al calor y a la luz, tiene un pH de 3 a 11, y es uno de los colorantes más usados en los alimentos.

1.3.2 ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son sustancias que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas, ya que tienen la capacidad de bloquear los efectos perjudiciales que provocan los radicales libres en el organismo. Hay 2 tipos de antioxidantes que son los naturales y los sintéticos. Los antioxidantes sintéticos son compuestos fenólicos que poseen en sus estructuras diversos grados de la sustitución de alquilo, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, los aminoácidos y aminas), carotenoides y ácido ascórbico. El estudio en los antioxidantes naturales ha aumentado notablemente. La capacidad de algunos compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes se ha dado a conocer en la literatura¹⁴.

1.3.3 POLIFENOLES

El concepto compuestos fenólicos abarca más de 8000 compuestos, todos poseen un rasgo estructural común, un fenol (un anillo aromático que contenga al menos un sustituyente hidroxilo¹⁴).

Los compuestos fenólicos se clasifican en fenoles simples y polifenoles, dependiendo del número de subunidades de fenol. Los fenoles simples incluyen los ácidos fenólicos y poseen un ácido carboxílico como grupo funcional. Contienen dos carbonos constitutivos que distinguen sus estructuras: las estructuras hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Los segundos tienen al menos dos subunidades, incluyen los flavonoides, estilbenos, y aquellos compuestos que poseen tres o más subunidades se conocen como taninos. El grupo más importante de los polifenoles, son los denominados flavonoides, esto constituye más de 5 000 compuestos ya identificados ¹⁴.

El árbol de cacao (*Theobroma cacao L.*) cada fruto contiene de 30 a 40 semillas que al pasar por un proceso de tostado, molido y al ser mezcladas con azúcar, vainilla y canela constituye la bebida más conocida como chocolate, esta bebida es consumida a nivel mundial por su agradable sabor, también lo utilizan en diversos productos de confitería como dulces, bombones o para dar sabor cuando se mezcla con leche¹⁵.

Muchos estudios muestran que los productos o derivados del grano del cacao son altos en antioxidantes, siendo la estructura básica las catequinas y epicatequinas; polifenoles parecidos a los que contienen los alimentos de origen vegetal, que son los encargados de otorgar resistencia a la peroxidación de la grasa del chocolate¹⁵.

En algunos lugares, en el que su consumo es alto, el chocolate brinda un contenido significativo en la carga total de antioxidantes que el organismo requiere diariamente¹⁵.

Algunas investigaciones *in vivo e in vitro* también sugieren que los polifenoles del chocolate pueden ser un importante medio para prevenir el riesgo de padecer enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer, ya que tienen la capacidad de retardar reacciones relacionadas en la oxidación de las grasas (LDL) o radicales libres que dañen la integridad de las células¹⁵.

Se entiende que la mayor capacidad antioxidante de la dieta se encuentra en frutas y vegetales, los polifenoles quienes son parte de los antioxidantes

contribuyen de manera trascendente, ya que actúan como donadores de hidrógenos o electrones encargados de atrapar a los radicales libres¹⁵.

Entre los polifenoles, los flavonoides poseen una estructura de 3 anillos consistente 2 anillos aromáticos (A y B) y un heterociclo oxigenado central (anillo C) y están peculiarmente combinados a azúcares, estos se clasifican en 6 subgrupos: flavonoides, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas y catequinas¹⁵.

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes que se encuentran en el cacao. Los productos de cacao poseen un contenido de flavonoides que varía, desde (0,09 mg de procianidinas/g) y otros con más contenido (4 mg de procianidinas/g), por lo que para lograr un efecto antioxidante inmediato en humanos se necesita consumir por lo menos 38 g de chocolate rico en flavonoides, y para tener un beneficio más duradero se estima consumir 125 g diario.

Para que los flavonoides del cacao ejerzan un efecto benéfico va a depender de su capacidad de absorción y de las propiedades de las sustancias resultantes. En un estudio con ratas quienes fueron alimentadas con polvo de cacao, se demostró que las epicatequinas son bien absorbidas en el sistema digestivo y distribuidas como formas conjugadas en el plasma, y rápidamente excretadas a través de la orina. Las procianidinas sufren descomposición a monómeros y dímeros en el estómago, lo que facilita su absorción intestinal, siendo particularmente las formas activas los metabolitos resultantes y/o conjugados de epicatequina¹⁵.

Como se ha venido diciendo el consumo de bebidas ricas en polifenoles como el té, disminuyen su capacidad antioxidante si se consumen junto con alguna bebida láctea porque las grasas que contienen los lácteos impiden que haya una buena asimilación. Sin embargo un estudio reciente no halló que se produzcan cambios en la capacidad antioxidante del chocolate al ser tomado junto con leche, ya que es un hábito muy común en todo el mundo¹⁵.

Los polifenoles presentes en la cocoa han mostrado retrasar la aparición de células de origen cancerígenas y regular los procesos de muerte celular programada. No existen investigaciones clínicas que demuestre el efecto inmune de la cocoa o de extractos de cocoa en seres humanos, pero estudios en animales han mostrado su efecto inmunomodulado¹⁶.

Algunas investigaciones sobre líneas celulares en humanos, han demostrado un efecto protector de los flavonoides de la cocoa contra la muerte celular inducida por estrés oxidativo. Un estudio *in vivo* realizado para evaluar el efecto inhibitorio de una procianidina químicamente sintetizada sobre el crecimiento de 16 líneas celulares de cáncer humano, mostró una inhibición selectiva en la proliferación de un subconjunto de líneas celulares, especialmente las de corto tiempo de duplicación; en contraste, las seis líneas celulares normales probadas, incluyendo células epiteliales mamarias y fibroblastos de la piel, fueron resistentes a la citotoxicidad de la procianidina¹⁶.

Los antioxidantes del chocolate también han mostrado beneficios prometedores sobre las células implicadas en la inmunidad innata y adquirida. Una revisión publicada en el 2009 concluyó como en diferentes estudios *in vitro*, regula tanto la activación de los macrófagos como de los linfocitos, aunque aclara que el alcance fisiológico de estos hallazgos es limitado pues el perfil de absorción de los flavonoides *in vivo* es diferente. También se ha investigado un posible efecto protector de los flavanoles del chocolate en enfermedades isquémicas cerebrovasculares que incluyen demencias¹⁶.

Según datos de la revista "Nature Neuroscience" sustenta que el cacao presenta propiedades neuroprotectoras las cuales son de gran importancia ya que revierte la pérdida de memoria en personas adultas¹⁷.

Uno de sus componentes, la epicatequina, un flavonol con acción antioxidante, ha demostrado su eficacia para revertir las pérdidas de memoria normales asociadas a la edad¹⁷.

1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja?

1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Conocimientos epidemiológicos han puesto en evidencia el papel que contienen los alimentos de origen vegetal en la prevención de ciertas enfermedades como cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Los antioxidantes naturales presentes en estos alimentos, entre los que resaltan los polifenoles, pueden ser responsables de esta función. La disponibilidad de los polifenoles naturales de los alimentos es muy variante, dependiendo del tipo de sustrato, la mayoría de ellos son metabolizados por los microorganismos del colon antes de ser absorbidos. Por otro lado, los avances tecnológicos y los estilos de vida y de preparación de alimentos de los consumidores también afectan notablemente a la ingesta de estas sustancias antioxidantes a su biodisponibilidad y a la función que cumplen cada uno de ellas. La presencia de compuestos fenólicos en los alimentos puede tener un efecto importante en la estabilidad a la oxidación y la seguridad microbiana de los alimentos. Además, muchos compuestos fenólicos en alimentos poseen una actividad funcional importante en relación con sus efectos inhibitorios sobre enfermedades de origen cancerígeno. Muchos alimentos de origen vegetal como los cereales, las semillas oleaginosas, legumbres, así como hierbas, especias y el té contienen polifenoles con actividad antioxidante potente. Por lo tanto, se ha incitado un interés cada vez mayor en la extracción y el uso de antioxidantes a partir de fuentes naturales. En el presente trabajo se desea determinar la capacidad antioxidante y los polifenoles totales presentes en los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*), el cual será de gran ayuda al explicar su potencial contribución a la prevención de algunas enfermedades vinculadas al estrés oxidativo.

1.6 HIPÓTESIS

- Implícita

1.7 OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante y polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.

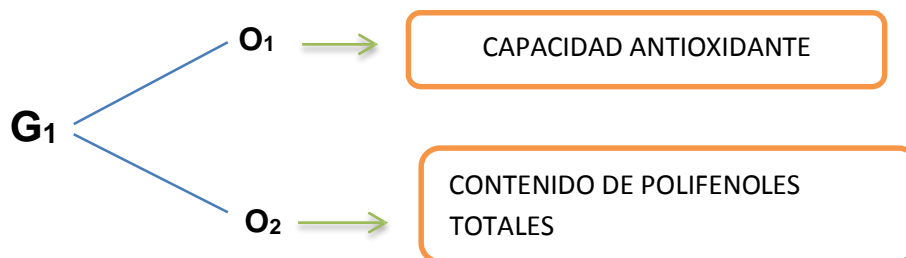
1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

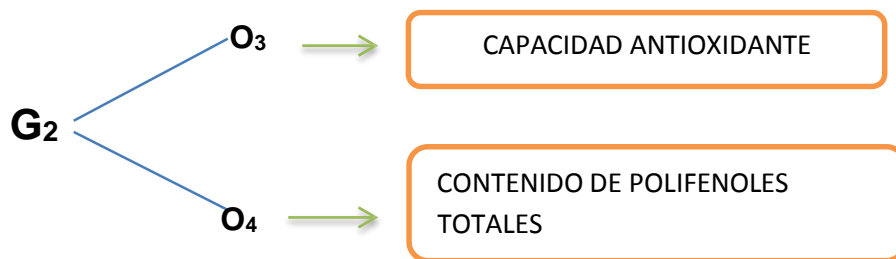
- Determinar la capacidad antioxidante del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.
- Comparar la capacidad antioxidante del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.
- Determinar el contenido de polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.
- Comparar el contenido de polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.

II. MÉTODO

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El presente fue un estudio de tipo descriptivo, prospectivo. El diseño de la investigación descriptivo exploratorio.





Dónde:

G₁: Los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) del distrito de Naranjillo

G₂: Los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) del distrito de Rioja

O₁, O₃: Capacidad antioxidante

O₂, O₄: Polifenoles totales

2.2. VARIABLES, OPERACIONALIZACIÓN

Para la operacionalización de las variables se consideró lo siguiente:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICION
Capacidad Antioxidante	Los antioxidantes son micro elementos presentes en la dieta que pueden retrasar o inhibir la oxidación de lípidos, por la inhibición o la propagación de la cadena oxidante reacciones, y también participan en la eliminación de los radicales libres ⁸ .	Se determinó mediante la técnica de Brand Williams (1995).	Se expresó en porcentaje	Cuantitativa continua
Polifenoles totales	El concepto compuestos fenólicos abarca más de 8000 compuestos, todos poseen un rasgo estructural común, un fenol (un anillo aromático que contenga al menos un sustituyente hidroxilo ¹⁴ .	Se determinó mediante el ensayo de Singleton y Rossi (1965).	mgGAE/100g	

2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

2.3.1. POBLACIÓN:

Los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) provenientes de las zonas de cultivo de los distritos de Naranjillo y Rioja.

2.3.2. MUESTRA:

Se empleó 1 muestra de grano de cacao (*Theobroma cacao L.*), secas provenientes de las zonas de cultivo de los Distritos de Naranjillo y Rioja.

2.3.3. MUESTREO:

Muestreo no probabilístico

2.3.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) secos en estado de madurez fisiológica, con características organolépticas aceptables, se recolectó las muestras en el mes de febrero, en época de verano.

2.3.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) secos que no hayan sido obtenidos en el periodo de estudio, que se encuentren en mal estado, sin presencia de plagas, picaduras de insectos o con algún daño físico o microbiológico.

2.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

- Identificación taxonómica en el herbario de la UNT

2.4.1. TÉCNICA: Técnica de Brand Williams¹⁸ (1995) – DPPH, Ensayo de Singleton y Rossi¹⁹ (1965) F- C.

Método del DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) para determinación de antioxidantes

El método fue desarrollado por Brand Williams et al¹⁸, el cual consiste en que el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) presenta un electrón dispar que en su estado normal es de color azul violeta, este pigmento frente a un antioxidante se ve alterada cambiando a un color amarillo pálido; la absorbancia se leyó a 515 nm. La diferencia de absorbancias, permitió obtener el porcentaje de captación de radicales libres.

Ensayo de Singleton y Rossi para la determinación de polifenoles totales

Este método se basa en la capacidad que poseen los fenoles para reaccionar ante agentes oxidantes, el reactivo de Folin Ciocalteau, se caracteriza por una mezcla de ácidos de color amarillo. Este método mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a una coloración azul que es observada a través del espectrofotómetro, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones¹⁹.

Preparación de reactivos

- Disolución de carbonato sódico al 2% en el que se disuelven 2 g en 100 ml de agua destilada. Se almacena a temperatura ambiente.
- Reactivo F-C al 50% en agua destilada (1 ml de Folin+ 1 ml de H₂O) en un frasco ámbar.
- Disolución patrón de ácido gálico 10 mg/ml en agua destilada. Se pesa 250 mg de ácido gálico en 5 ml de etanol y 25 ml de agua destilada. Se almacena en la nevera. La disolución de trabajo se prepara diariamente a partir de la madre, posteriormente se toma 1 ml y se lleva a 10 ml con agua destilada.

Modo operatorio

- Curva de calibrado patrón

Para preparar la disolución de trabajo a partir de la disolución de ácido gálico madre, se tomaron 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, y 0.7 µl luego se lleva a 100 µl con agua destilada + 3 ml disolución de carbonato 2%+ 100 µl Folin – Ciocalteau. Se agita y se deja en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente en un lugar oscuro, transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia a 765 nm²⁰.

2.4.2. INSTRUMENTO:

- Ficha de recolección de datos

2.4.3. PROCEDIMIENTO:

Los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) se adquirieron de la selva peruana de los distritos de Naranjillo y Rioja tomados de dos campos distintos.

Preparación de la dilución hidrometanólica para determinar la capacidad antioxidante:

El extracto de cacao (*Theobroma cacao L.*) fue sometido a una dilución de 1/50, en donde 1ml es el sobrenadante más 24.5 ml de agua destilada y 24.5 ml de alcohol metílico y finalmente 10 gotas de ácido clorhídrico. Esta dilución se usó para medir la capacidad antioxidante del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*). Luego de llevarse a cabo la preparación de la dilución hidrometanólica, se realizó la determinación de la capacidad antioxidante total:

Determinación de la capacidad antioxidante total:

De la dilución hidrometanólica se tomó 0.1ml con una micropipeta y se colocó en tubos de ensayo con 3.9ml de la solución de DPPH•, este proceso se realizó 4 veces por cada una de las muestras.

Posteriormente se mezclaron las muestras llevándose a 30 minutos en oscuridad y luego a 60 minutos. Pasado el tiempo de la reacción del radical y el diluido hidrometanólico indicado anteriormente, se llevó al espectrofotómetro a 515 nm para medir las absorbancias²¹.

$$\% \text{ la a t i v i a a n t i o x i a n t e t a l} = \frac{\text{abs. inicial} - \text{abs. final}}{\text{abs. inicial del DPPH} \bullet} \times 100$$

Preparación de los extractos para determinar polifenoles

Para determinar polifenoles totales extraíbles, fueron cuantificados por el método Folin-Ciocalteu, se usó el reactivo ácido gálico como estándar, para esto la muestra fue mezclada con una solución metanol/agua (50:50 v/v), y durante 1 hora se mantuvo agitando la muestra a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 3000rpm×10min, el sobrenadante se mezcla con una solución acetona /agua (70:30 v/v), se agita y se centrifuga, luego se repite este último paso y posteriormente ambos sobrenadantes se mezclaron y se enrasaron con agua destilada hasta un volumen de 100 ml²².

Determinación de fenoles solubles totales

Para la determinación de fenoles totales se procedió a tomar 100 µL de los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) posteriormente se agregó 3 mL de una disolución de carbonato sódico al 2 %. Luego se agregó 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % (v/v), se agitó y se dejó en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Luego se procedió a medir la absorbancia a 765 nm²².

2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó la estadística descriptiva DE (desviación estándar) para determinar los resultados del promedio del porcentaje de la capacidad antioxidante y polifenoles totales mgGAE/100g de muestra seca. Se usó

la prueba de normalidad y según los resultados estadísticos que arrojó,

se eligió trabajar con la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia de 0.05 para evaluar si existe diferencia entre los promedios de la capacidad antioxidante del Cacao de Naranjillo y Rioja. Para evaluar la diferencia de mgGAE/100g del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) procedente de Naranjillo y Rioja se utilizó la prueba de ANOVA de un factor con nivel de significancia de 0.05.

2.6. ASPECTOS ÉTICOS

- Se tomó en cuenta la veracidad de los datos, la protección, conservación del ambiente y de la propiedad intelectual de igual forma se protegió la identidad del productor de las muestras.
- Se tuvo en cuenta que los resultados sean reales, no inventados o plagiados.
- Se tuvo en cuenta las medidas de bioseguridad necesaria para proteger la salud del analista.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Capacidad antioxidante del grano de cacao (*Theobroma cacao L*) provenientes de los distritos de Naranjillo y Rioja.

MUESTRA	X
Naranjillo	41.83%
Rioja	40.24%

Tabla 2. Prueba de Kruskal- Wallis comparar los porcentajes de capacidad antioxidante del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) procedente de Naranjillo y Rioja a los 60 minutos.

Mediana	n	Rango promedio	
35.51	4	3.50	Naranjillo
40.53	4	5.50	Rioja
37.02	8		Total

1,333 Chi-cuadrado
 1 gl
 0.248 Sig. Asintót.

Al usar el método no paramétrico de Kruskal Wallis ponen en manifiesto que no existe diferencia significativa entre la capacidad antioxidante en las distintas muestras ($p > 0.05$).

Tabla 3. Contenido de polifenoles totales expresado en mgGAE/100 g muestra seca presentes en los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.

	X ± $\bar{\sigma}$
MUESTRA	mg GAE/100g
Naranjillo	1870.46 ± 3.6
Rioja	1224.82 ± 1.9

Tabla 4. Prueba de ANOVA de un factor para comparar el contenido de polifenoles en mgGAE/100g del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) procedente de Naranjillo y Rioja.

Polifenoles					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0.721	1	0.721	0.000	0.999
Intra-grupos	1748007.984	4	437001.996		
Total	1748008.706	5			

Al usar el método paramétrico ANOVA de un factor ponen en manifiesto que el contenido de polifenoles totales en las distintas muestras, no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

Hace más de dos siglos se ha considerado al cacao como uno de los alimentos más importantes a nivel mundial, en la industria de alimentos, fármacos y cosmetológica; ya que se usa como materia prima para obtener antioxidantes naturales⁶.

El estudio de alimentos antioxidantes y compuestos fenólicos constituye una de las ramas con mayor investigación en los últimos años, por su importancia en la salud y en la prevención de múltiples enfermedades de origen oxidativo (cardiovasculares, tumores, procesos reumáticos, diabetes, inflamatorias), por su capacidad antioxidante por ejemplo como es el caso de la vitamina E, C y β -caroteno y un conjunto de compuestos fenólicos⁵. Por otro lado Vásquez et al²³ sostiene que los compuestos fenólicos, están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal que de manera directa influyen en el sabor y aroma de las almendras. El cacao es uno de los frutos con un alto contenido de antioxidantes y polifenoles²³.

El objetivo general del presente trabajo de investigación, fue determinar la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja; con el propósito de contribuir con la sociedad en la prevención de ciertas enfermedades crónicas cuya aparición es retrasada y están vinculadas al estrés oxidativo.

Como se puede observar en la Tabla 1 los granos de cacao del distrito de Naranjillo presentan mayor capacidad antioxidante con un valor de 41.83% mientras que los granos de cacao del distrito de Rioja con 40.24%. Estos datos son semejantes a los reportados por Sotero et al⁴ quienes evaluaron la capacidad antioxidante de las pulpas y semillas del cacao, cacahuillo y copozú, siendo el cacao uno de los frutos con mayor capacidad antioxidante con 33.50%.

Sin embargo el autor Perea et al⁷, menciona que las propiedades se ven afectadas mediante el proceso de transformación que pase el grano, en especial durante el proceso de tostado, en la que se observan pérdidas significativas de un 23% con respecto a la materia prima sin transformar.

Recientemente hay poca información sobre la recomendación diaria de polifenoles en la dieta.

Al comparar los promedios de la actividad antioxidante del cacao de los distritos de Naranjillo y Rioja, mediante la prueba de Kruskal- Wallis para tiempo de 60 minutos, se observó que no existe diferencia significativa entre la capacidad antioxidante de ambas muestras ($p > 0.05$) (Tabla 2).

En la Tabla 3 se puede observar que el contenido total de polifenoles en los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) distrito de Naranjillo es de 1870.46 mg/100g, mientras que el contenido de polifenoles totales del cacao del distrito de Rioja es menor siendo 1224.82 mg/100g. Lo que se asemeja con la evaluación que realizaron Rojano et al²⁴ en la pulpa de curuba, la cual posee un contenido de fenoles igual a 5 012,8 mg/100g de pulpa seca.

Padilla et al⁵ evaluaron la cantidad de polifenoles en semillas de diferentes frutos entre ellos el *Theobroma cacao* (cacao), *Campsiandra comosa* Benth (chiga), *Sorghum bicolor, L. Moench* (sorgo), *Melicoccus bijugatus* (mamón). Dando como resultado que las semillas de pericarpio del mamón presentó el más bajo contenido de polifenoles (1,40 GAEG/100g) y el cacao el más alto (6,66 GAEG/100g).

En otro estudio Nazario et al²⁵ evaluaron el contenido de polifenoles totales en los granos de cacao y siete clones, en el que encontró que los clones SCA-6 (forastero) fue 5,721 y ICS-95 (trinitario) 5,592 GAEG/100g respectivamente. En ambos estudios se evidencia que el cacao es uno de los frutos con mayor contenido de polifenoles comparados con otras semillas, lo que se relaciona con el autor Padilla et al⁵, quien determinó que el contenido de polifenoles se relaciona bien con la actividad antioxidante del grano de cacao.

De acuerdo a los datos obtenidos anteriormente 5 g de cacao aporta a la dieta 93.5 mg de polifenoles totales. Según Bartolomé et al²⁶ la presencia de polifenoles como parte de los hábitos diarios de la alimentación de un individuo, previenen las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, también tienen un efecto sinérgico con la microbiota oral e intestinal. Lo que se asemeja a los estudios realizados por Buijsse et al²⁷ realizado en 470 hombres que no

presentaron enfermedades cardiacas ni diabetes, se pudo comprobar que a mayor consumo de cacao o derivados de este, se asocia significativamente a un menor riesgo y muerte por ECV. Los que consumieron en mayor cantidad (2.3 g/día) comparado al tercio de menor consumo (0.36 g/día) presentaron un 50% de menor mortalidad. Por otro lado Sotero et al⁴ menciona que los polifenoles no lo sintetiza el organismo si no debemos consumirlo exógenamente de las frutas y verduras.

Asimismo al realizar la comparación de los promedios del contenido de polifenoles totales del grano de cacao, mediante la prueba ANOVA se observó que no existe diferencia significativa entre el contenido de polifenoles totales de ambas muestras ($p > 0.05$) (Tabla 4).

IV. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del presente estudio se concluye lo siguiente:

1. Se logró determinar la capacidad antioxidante del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*), de los distritos de Naranjillo y Rioja, siendo mayor en el cacao del Distrito de Naranjillo (41.83%) y menor en el cacao distrito de Rioja (40.24%).
2. Se pudo determinar el contenido de polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja, observándose que el cacao del Distrito de Naranjillo presentó el mayor contenido de polifenoles (1870.46) y menor en el distrito de Rioja (1224.82 mg/100g).
3. No existe diferencia significativa entre la capacidad antioxidante ($p=0.248$) y el contenido de polifenoles ($p=0.99$) del grano de cacao procedente de los distritos de Naranjillo y Rioja.

V. RECOMENDACIONES

- Promover el estudio de alimentos vegetales que permitan poner en manifiesto el mecanismo de acción de los polifenoles, utilizando sus características antioxidantes para el beneficio del ser humano.
- Incentivar el consumo de cacao puro, ya que es una fuente rica en antioxidantes y polifenoles, necesarias para aminorar y prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer, neurodegenerativas, etc.
- Lograr que la población tome conciencia sobre la importancia de los buenos hábitos alimenticios y la relación directamente proporcional que tienen en una vida saludable.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

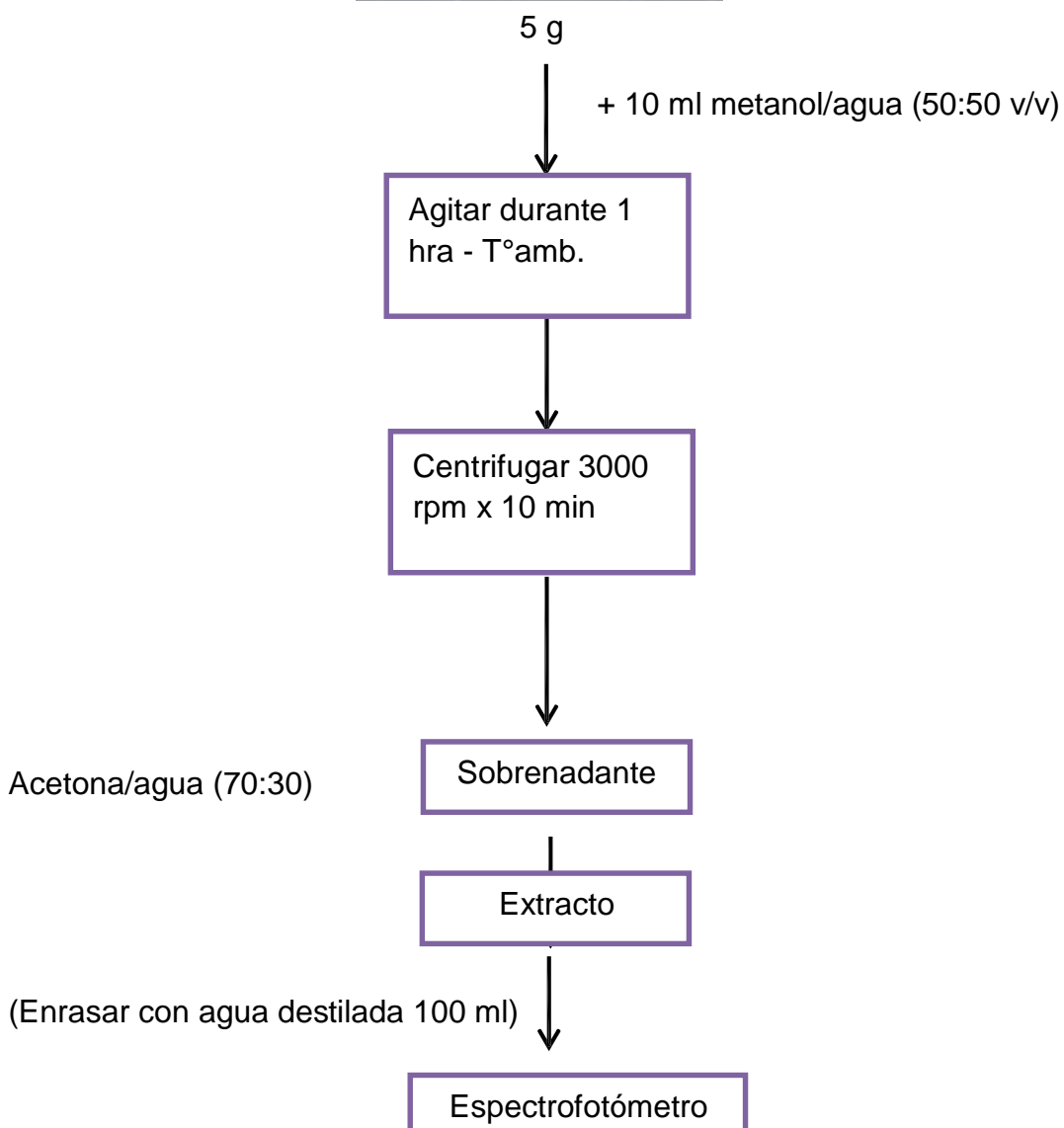
1. Barberán T. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Rev alim nutri salud. 2003; 10 (2):41-42.
2. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Madrid. Rev Nutr. Hosp. 2012. 27(1).
3. Periago J, Gonzales R. Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en polifenoles para el diseño de un chocolate enriquecido [Tesis Doctoral]. Repositorio Institucional de la Universidad de Murcia. 2006.
4. Sotero V, Maco M, Vela J, Merino C, Dávila E, García D. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia *Sterculiaceae*. Rev Soc Quím Perú. 2011; 77 (1): 66-67.
5. Padilla F, Rincón A, Bou-Rached L. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. Rev. ALAN. 2008; 58(3): 303-304.
6. Chávez R, Ordoñez E. Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. Rev del encuentro científico int. 2013;10 (1): 42-50.
7. Perea J, Cadena T, Herrera J. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. Rev Univ. Ind. Santander. Salud. 2009; 41(2): 119.
8. Othman A, Ismail A, Abdul N, Adenan I. La capacidad antioxidante y el contenido fenólico de los granos de cacao. Rev Química de alimentos. 2007; 100 (4) 1523 -1530.
9. Loannone F, Di Mattia C, De Gregorio M, Sergi, Serafini M, Sacchetti G. Flavonols proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. Rev food chem. 2014; 60: 174-256.

10. Carrillo L, Londoño J, Gil A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa growing areas in Colombia. *Rev Food Research int.* 2014; 60: 273- 280.
11. Zapata S, Tamayo A, Alberto B. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Rev Cubana Plant. Med.* 2013; 18(3).
12. Zipperer P. “The manufacture of chocolate and other cacao preparations”. 2ed. Berlín. 2003.
13. Kalvatchev Z, Garzaro G, Guerra F. THEOBROMA CACAO L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Rev Agroalimentaria.* 1998. 23-24.
14. Juárez B, López L. “Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos acuosos y etanólicos de diversas variedades de maíz del estado de México, sobre ABTS y peróxido de hidrógeno como especie reactiva de oxígeno”. [Tesis para optar el título de químico en alimentos]. México: Universidad Autónoma del Estado de México; 2014.
15. Gutiérrez B. Chocolate. Polifenoles y Protección a la salud. *Rev Acta Farm. Bonaerense.* 2002. 21 (2):149-150.
16. Gómez M, Gonzales L, Bravo L, Vaquero M, Bastida S. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Rev Nutr. Hosp.* 2011; 26(2): 289-290.
17. Brickman A, Khan U, Provenzano F, Yeung L, Suzuki L. *Rev nat Neurosci.* 2014; 17: 1798- 1803.
18. Tovar J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. [Tesis para optar el título de químico industrial]Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
19. Anticon M. Determinación de polifenoles totales en arándanos y productos derivados. [tesis doctoral] Universidad de valencia. 2014.
20. George S, Brat P, Alter P, Amiot M. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Rev Journal of agricultural and food chemistry.* 2005; 1370-1373.

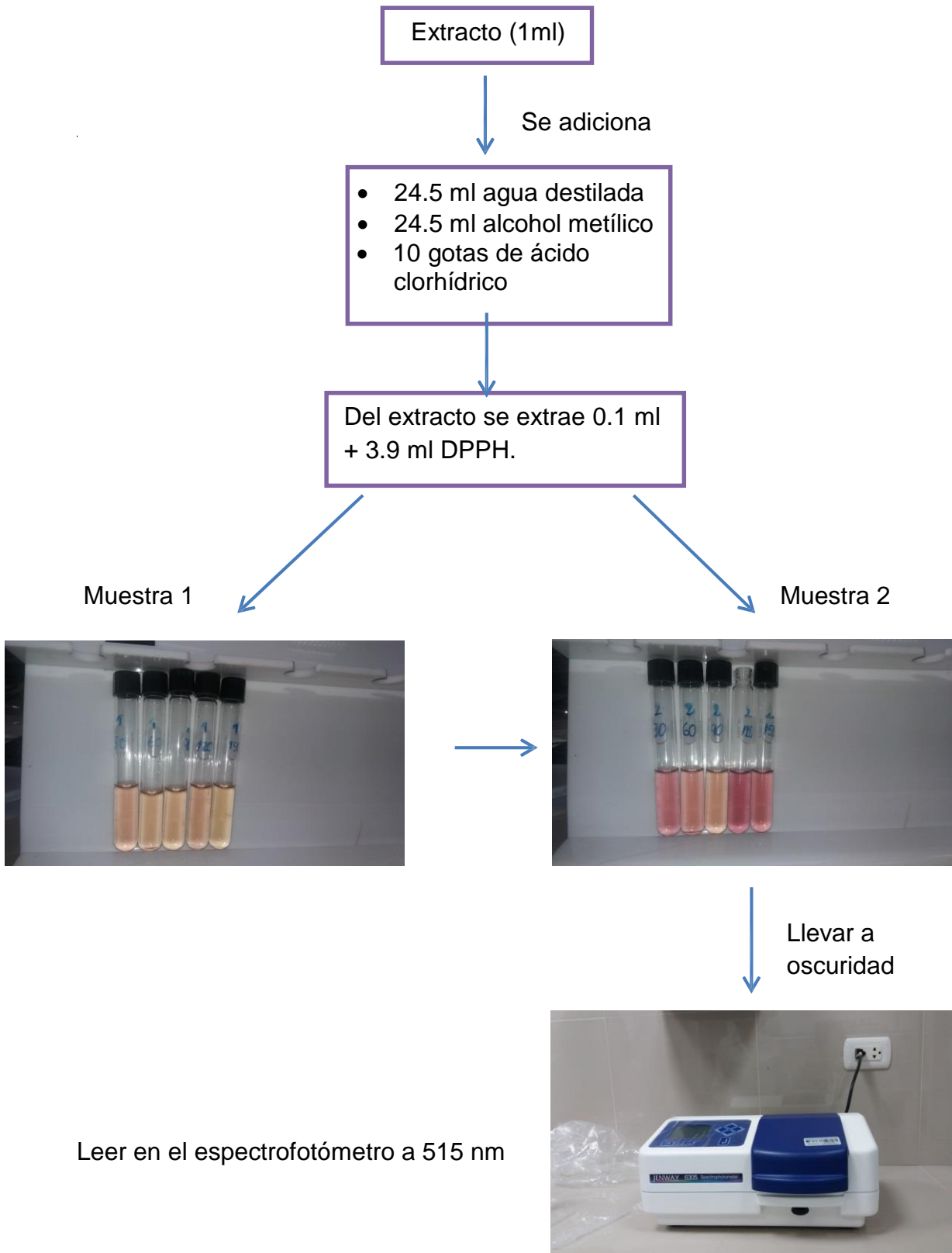
21. Ruíz S, Venegas E, Díaz H, Rodríguez I. Capacidad antioxidante in vitro de las isoflavonas totales obtenidas de semillas de glycine max L. (soya) provenientes de la provincia de Jaén-Cajamarca. Rev UCV–Scientia. 2012; 4(1):27-28.
22. Ramírez A, Pacheco E. Composición Química y Compuestos Bioactivos Presentes en Pulpas de Piña, Guayaba y Guanábana. Rev Interciencia. 2011; 36(1):72-73.
23. Vásquez A, Ovando I, Adriano L, Betancur D, Salvador M. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. Rev Arch Latino Nutr. 2016; 66(3): 244- 245.
24. Rojano B, Zapata K, Cortes F. Capacidad atrapadora de radicales libres de Passiflora Mollissima (Kunth) L. H. Bailey (Curuba). Rev. Cubana plant Med.2012; 17(4).
25. Nazario O, Ordoñez E, Mandujano Y, Arévalo J. Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (Theobroma cacao L.) criollo y siete clones. Rev investigación y amazonia. 2014; 3 (1): 51- 59.
26. Bartolomé B, Moreno M. Polifenoles del vino y microbiota humana: modulación y metabolismo. Rev Avances en alimentación, nutrición y dietética. 155.
27. Buijsse B, Feskens E, Kok F, Kromhout D. El consumo de cacao, la presión arterial y la mortalidad cardiovascular: el estudio de ancianos Zutphen. Rev Arch intern med. 2006; 166(4): 411-7.

ANEXOS

Anexo 1. Método de extracción para determinar capacidad antioxidante (Ramírez et al²²).



Anexo 2. Preparación de la dilución hidrometanólica para determinar la capacidad antioxidante según Ruiz et al²¹.



Anexo 3.

Tabla1. Absorbancias de la capacidad antioxidante medidas en el espectrofotómetro de 30 a 60 min por cada muestra de cacao.

MUESTRAS	INICIAL	30'	60'
1	0.719	0.412	0.251
1	0.719	0.528	0.461
1	0.711	0.53	0.489
1	0.717	0.491	0.465
2	0.719	0.547	0.409
2	0.732	0.485	0.454
2	0.719	0.58	0.404
2	0.69	0.46	0.441

Anexo 4.

Tabla 2. Promedio de las repeticiones de las absorbancia de la capacidad antioxidante de los granos de cacao (*Theobroma cacao L.*) del distrito de Naranjillo y Rioja.

PROCEDENCIA	Inicial	30 min	60 min
1. Granos de cacao (<i>Theobroma Cacao</i>) del distrito de Naranjillo	0.717	0.490	0.417
2. Granos de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) del distrito de Rioja	0.715	0.518	0.427

Anexo 5.

Tabla 3. Porcentaje de las repeticiones de las 2 muestras para la determinación de capacidad antioxidante de los granos de cacao.

MUESTRAS	30´	60´
1	42.698%	65.09%
1	26.564%	35.883%
1	25.457%	31.223%
1	31.5%	35.146%
2	23.92%	43.1%
2	33.743%	37.978%
2	19.332%	43.81%
2	33.333%	36.086%

Anexo 6.

Tabla 4. Capacidad antioxidante del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.

MUESTRA	X1 % Inhibición	X2 % Inhibición	X3 % Inhibición	X4 % Inhibición	X
Naranjillo	65.09	35.88	31.22	35.14	41.83
Rioja	43.1	37.97	43.81	36.08	40.24

Anexo 7.

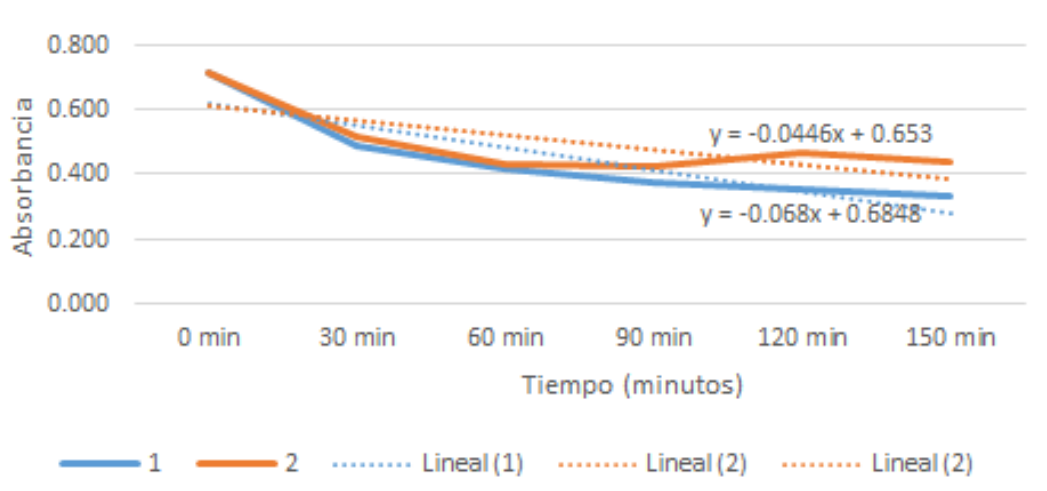


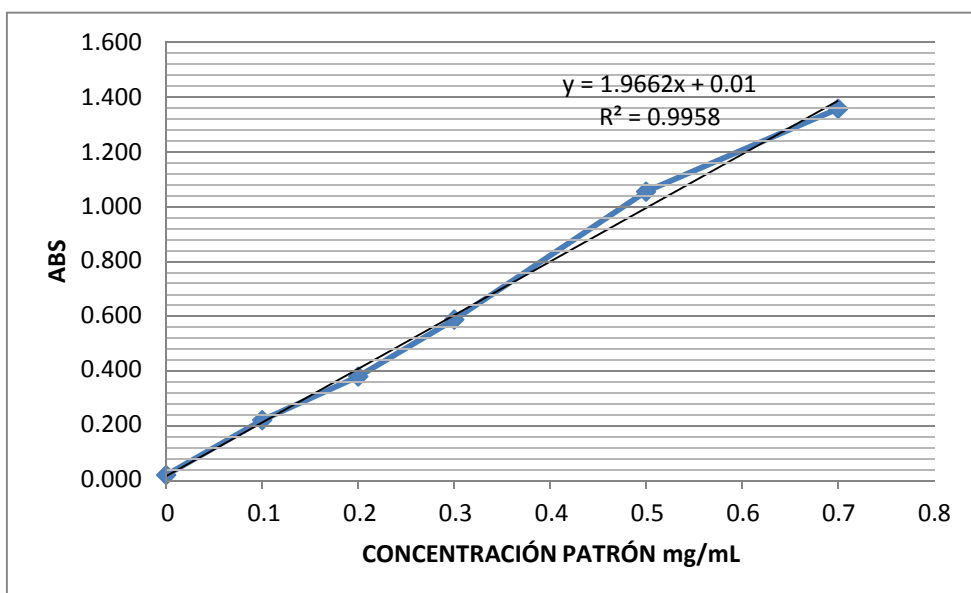
Figura 1. Comparación de la actividad antioxidante de *Theobroma cacao* procedente de los distritos de Naranjillo y Rioja según el método DPPH.

Procedencia	Velocidad de actividad antioxidante (Unidades de absorbancia/minuto)
Naranjillo	0.044
Rioja	0.068

Anexo 8.

Curva de calibrado patrón (ácido gálico) puesta a punto

mg/mL Patrón	ABS
0	0.014
0.1	0.216
0.2	0.375
0.3	0.584
0.5	1.053
0.7	1.357



Representación de la curva de calibrado patrón del ácido gálico

Anexo 9. Protocolo para la determinación de fenoles solubles totales

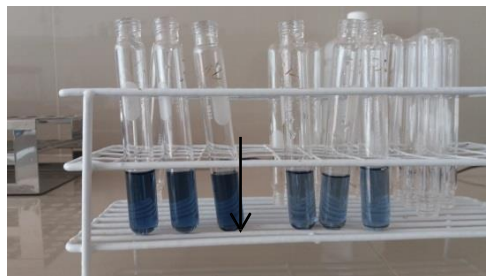
Extracto de los granos de cacao de las 2 muestras



100 μ L de muestra+ 3 ml de carbonato sódico al 2 %.
Añadir 100 μ L de folin.



Reposo durante 1 hora a T°ambiente



← Espectrofotómetro 765nm

Anexo 10

Tabla 5. Contenido de polifenoles totales del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) de los distritos de Naranjillo y Rioja.

MUESTRA	X1 mg GAE/100g	X2 mgGAE/100g	X3 mg GAE/100g	X ± $\bar{\sigma}$ mg GAE/100g
Naranjillo	1454.73	2002.03	2154.63	1870.46 ± 3.6
Rioja	1344.86	1324.52	1005.09	1224.82 ± 1.9

Tabla 6. Prueba de homogeneidad de varianzas de los contenidos de polifenoles de cacao de los distritos de naranjillo y Rioja.

Polifenoles		gl1	gl2	Sig.
Estadístico de Levene	5,065	1	4	,088

Anexo 11. Determinación taxonómica de la planta de cacao (*Theobroma cacao* L.)

DESGLOSABLE

Apellidos y Nombres: Esperza Otero Rosa Medy DNI 49230130

Objeto de la Solicitud: (Indicar en forma clara lo que solicita y detallar documentos que adjunta)
Determinación taxonómica de una planta.

Familia: MALVACEAE

N.C.: *Theobroma cacao* L.

Nº Procedimiento del TUPA: 142

Recibo Caya Nº 29-150-1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD U OFICINA Herbario HUT

FECHA 02/03/2017 HORA: 12:37pm.

RECEPCIONISTA: Eric F. Rodriguez P.

AUTOMATICO S.A. (+) S.A. (-)

PLAZO ATENCIÓN (Según TUPA): 07 días háb.

REGISTRO _____ FIRMA [Firma]

DISTRIBUCIÓN GRATUITA