

MEMORIA DE INVESTIGACIÓN: TRABAJO FIN DE MÁSTER

**EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN Y EL TOSTADO
SOBRE LA CONCENTRACIÓN POLIFENÓLICA Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CACAO
NICARAGÜENSE.**

TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS
AGROALIMENTARIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

Yader S Suazo Mercado

Dirigido por:

Dr. Iñigo Arozarena Martincorena

Pamplona, Mayo 2012

Iñigo Arozarena Martincorena, profesor del Departamento de Tecnología de Alimentos, autoriza la presentación por parte de Yader Salvador Suazo Mercado del Trabajo Fin de Master titulado *“efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense”*.

En Pamplona, a 16 de mayo de 2012

Fdo. Iñigo Arozarena Martincorena

Agradecimientos

Al profesor Iñigo Arozarena; por su apoyo y guía durante la realización de este trabajo, al profesor Jesús Echeverría, por hacer posible mi master y fortalecer mi fe en Dios y a Gabriel Davidov, por mostrarme el camino y tenerme mucha paciencia, y a mi esposa Ligia e hijos Doan y Yader, pues siempre me dieron fuerzas cuando me sentía agotado. Finalmente, al programa Erasmus Mundus, por darme una oportunidad de formarme a mi corta edad.

ÍNDICE

ÍNDICE	02
ÍNDICE DE TABLAS	04
ÍNDICE DE FIGURAS	05
<i>RESUMEN</i>	07
1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	08
1.1. Introducción	08
1.2. Breve historia y Características de la semilla de cacao	11
1.3. Variedades de semilla de cacao	13
1.3.1. Cacao criollo o nativo	13
1.3.2. Cacao forastero	13
1.3.3. Cacao trinitario	14
1.4. Derivados de la semilla de cacao	14
1.5. Producción y consumo de cacao	20
1.6. Polifenoles y antioxidantes de la semilla de cacao	22
1.6.1. Subdivisión de los polifenoles.	23
1.6.2. Taninos	25
1.6.3. Función de los Antioxidantes.	26
1.7. Procesos que impactan la concentración de polifenoles	27
1.7.1. Fermentado de la semilla de cacao	27
1.7.2. Tostado de la semilla de cacao	33
1.8. Objetivos y plan de trabajo	36

2. MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	37
2.1. Muestras de cacao y diseño experimental	37
2.2. Solventes y reactivos	38
2.3. Tostado del cacao	39
2.4. Obtención de los extractos polifenólicos	39
2.4.1. Desgrasado del cacao	40
2.4.2. Extracción de los compuestos fenólicos	40
2.5. Determinación de la humedad	41
2.6. Determinación de la composición fenólica global, actividad antioxidante y color	41
2.6.1. Método de Folin-Ciocalteu	42
2.6.2. Determinación de la actividad antioxidante (AA)	42
2.6.3. Determinación de la intensidad del color	43
2.7. Tratamiento Estadístico de los datos	43
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1. Caracterización inicial de las muestras (CSF/ CF-BC / CF-AC)	44
3.2. Efectos del tostado en las muestras de cacao	45
4. CONCLUSIONES	51
5. REFERENCIAS	52
6. ANEJO I	57
6.1. Certificado Fitosanitario MAGFOR	58
7. ANEJO II	59
7.1. Ficha de Control de Calidad CSF	60
7.2. Ficha de Control de Calidad CF-AC	61
7.3. Ficha de Control de Calidad CF-BC	62

ÍNDICE DE TABLAS

1.	Tabla 1.1. Producción de granos de cacao en el mundo.	20
2.	Tabla 1.2. Principales consumidores de cacao en el mundo.	21
3.	Tabla 2.1. Diseño experimental del tostado	38
4.	Tabla 2.2. Cuadro de extracciones y análisis realizados durante el trabajo experimental.	38
5.	Tabla.3.1. Caracterización inicial de las muestras de cacao.	44
6.	Tabla.3.2. Efecto de tres diferentes temperaturas de tostado en muestra de cacao sin fermentar – CSF.	45
7.	Tabla.3.3. Efecto de las diferentes temperaturas de tostado en muestra de cacao fermentado de baja calidad= CF-BC.	46
8.	Tabla.3.4. Efecto de las diferentes temperaturas de tostado en muestra de cacao fermentado de alta calidad= CF-AC.	46
9.	Tabla.3.5. Efecto del tostado a temperaturas intermedio en muestra de CSF	47
10.	Tabla.3.6. Efecto del tostado a temperaturas intermedio en muestras de CF-AC	47

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1.1. (a) Mapa de Nicaragua, geo-referenciado con el potencial edafoclimático del cultivo de cacao y (b) potencial edafoclimático del cultivo de cacao en zonas de pobreza.	09
2. Figura.1.2. Fruto que contiene las semillas de cacao.	11
3. Figura.1.3. Semillas del cacao recién cosechado.	11
4. Figura.1.4. Semillas secas del cacao	11
5. Figura. 1.5. Fenotipo del fruto de cacao de la variedad Criollo	13
6. Figura. 1.6. Fenotipo del fruto de cacao de la variedad Forastero	14
7. Figura. 1.7. Fenotipo del fruto de cacao de la variedad Trinitario	14
8. Figura. 1.8. Diagrama industrial del proceso de elaboración de derivados	15
9. Figura. 1.9. Manteca de Cacao	16
10. Figura. 1.10. Polvo de cacao	16
11. Figura. 1.11. Molido del cacao para obtención del licor	17
12. Figura. 1.12. Tableta de chocolate negro (oscuro)	18
13. Figura. 1.13. Repostería con cobertura	18
14. Figura. 1.14. Chocolate a la taza	18
15. Figura. 1.15. Chocolate con leche	19
16. Figura. 1.16. Chocolate blanco	19
17. Figura. 1.17. Chocolate de cobertura o relleno	19
18. Figura. 1.18. Porcentaje de compuestos polifenólicos en los cotiledones de la semilla fresca de cacao	22
19. Figura. 1.19. Estructura Química de los Fenoles	23
20. Figura. 1.20. Estructura química del ácido gálico (Izq.) y del ácido cinámico (Der.) pág.	23
21. Figura. 1.21. Estructura básica de los flavonoides, sin sustituyentes.	24
22. Figura. 1.22. Clasificación estructura básica de los diferentes flavonoides	24
23. Figura. 1.23. Estructuras químicas de los taninos. Ejemplo de un “galotanino” y de un “elagitanino”	25

24.	Figura. 1.24. Partido de la fruta de cacao apropiado para extracción de las semillas.	27
25.	Figura. 1.25. Partido de la fruta de cacao no apropiado para extracción de las semillas.	27
26.	Figura. 1.26. Cajones de madera para fermentar semillas de cacao, tapados de diversas formas.	28
27.	Figura. 1.27. Fermentación de semillas de cacao sobre el suelo con hojas de plátano.	28
28.	Figura. 1.28. Fases de la fermentación de la semilla de cacao	29
29.	Figura. 1.29. Toma de temperatura de las semillas en fermentación para proceder al volteo	29
30.	Figura. 1.30. Secado al sol de semillas de cacao fermentadas.pág.	30
31.	Figura. 1.31. Cronología del fermentado de la semilla de cacao y secado al sol	30
32.	Figura. 1.32. Secado de semillas de cacao fermentadas en hornos calentado con leña	31
33.	Figura. 1.33. Evidencias de cambios en la coloración del cotiledón durante la fermentación de la semilla de cacao. a) Semilla no fermentada, b) Semilla fermentada.	31
34.	Figura. 1.34. Grafico de pérdida de compuestos fenolicos totales en las semillas de cacao durante la fermentación (3 y 7 días) y al termino de secado natural y artificial.	32
35.	Figura. 1.35. Cuantificación relativa de Flavonoides y procianidinas en semillas de cacao durante la fermentación y al término de secado.	32
36.	Figura. 1.36. Evolución del ratio OD460/OD525 durante el tostado de café a distintas temperaturas.	35
37.	Figura. 2.1. Estufa modelo Digitronic (SELECTA, Barcelona, España)	39
38.	Figura. 2.2. Adaptación de Esquema empleado en el acondicionamiento de la muestra y extracción.	39
39.	Figura. 2.3. Centrífuga modelo Medifriger. BL-S (SELECTA-Barcelona, España)	40
40.	Figura. 2.4. Orbital mini Shaker (VWR. EE.UU)	41
41.	Figura. 3.1. Tendencias del color del CSF, en función de la temperatura de tostado.	48
42.	Figura. 3.2. Tendencias del color del CF-BC, en función de la temperatura de tostado.	48
43.	Figura. 3.3. Tendencias del color del CF-AC, en función de la temperatura de tostado.	49
44.	Figura. 3.4. Tendencias del color del CSF, en función de la temperatura 130 °C y tiempo intermedios de tostado.	49
45.	Figura. 3.5 Tonalidad de las muestras de cacao antes y tras los tratamientos de tostado.	50

Resumen

Este trabajo tiene como finalidad hacer una caracterización del contenido en polifenoles totales (PT) y la actividad antioxidantes (AA) de varias muestras de semillas de cacao (*Theobroma cacao L.*) fermentadas y sin fermentar, de la variedad Trinitario, y procedentes de Nicaragua. Y además evaluar el efecto del tostado sobre dichas características y el color de los extractos fenólicos de las semillas. Los tratamientos de tostado fueron a 110 °C por 90 min, 130 °C por 60 min y 150 °C por 45 min. Las semillas provinieron específicamente del centro de acopio nacional de la empresa Ritter Sport (Alemania), situada en Matagalpa (Nicaragua) que donó tres tipos de cacao: cacao sin fermentar (CSF), cacao fermentado amargo o de baja calidad (CF-BC) y cacao fermentado de alta calidad (CF-AC). En el trabajo se pusieron a punto los procedimientos de desgrasado y posterior extracción de los compuestos fenólicos de las semillas. Para la cuantificación de PT se empleó el método de Folin-Ciocalteu, y para estimar la AA el método DPPH. Se comprobó que las muestras presentaron valores en PT semejantes a las encontradas en la bibliografía para cacaos de la misma u otras variedades y de otras procedencias. La muestra CSF presentó una riqueza polifenólica, una AA y una intensidad de color muy superior a las muestras fermentadas, así como un color más rojizo. El tostado provocó una disminución significativa de la riqueza en polifenoles de las semillas, no así de la actividad antioxidante que, o bien no varió o bien aumentó, sobre todo tras el tostado a 150°C. Se observó también un pardeamiento progresivo del color del cacao durante el tostado, tanto más intenso cuanto más elevada fue la temperatura de tostado.

Capítulo 1

Antecedentes y Objetivos

1.1 Introducción

El árbol *de cacao* es conocido porque sus semillas son la principal materia prima en la elaboración del chocolate. Sin embargo, en sus cáscaras y semillas se encuentran polifenoles de gran valor en la prevención de enfermedades crónicas de importancia en el ser humano. Esto debido a que entre estos polifenoles se encuentran antioxidantes específicos (catequinas, epicatequinas y procianidinas), similares a aquellos encontrados en las verduras y el té, con efectos preventivos ante enfermedades de importancia ¹. En la actualidad esta semilla es producida en países en desarrollo de América, Asia, Oceanía y África. En Nicaragua, país centroamericano, la producción más importante proviene de Waslala, un pequeño municipio del norte del país. ²

Hay que recordar que el cacao nicaragüense ya fue parte de la historia de la industria chocolatera en el mundo. En periodos posteriores a la conquista, el cacao producido por los indígenas nicaragüenses era enviado cada año a Castilla, para su consumo por parte de la casa real del imperio Español. Como actividad comercial importante de ese tiempo, el grano de cacao sirvió hasta de moneda facilitando la circulación de las riquezas entre la sociedad nicaragüense.

Durante el siglo XVII (1736), la producción de cacao de alta calidad de 400 haciendas (ubicadas en El Valle Menier, Nandaime) era exportada a **Francia** para la elaboración de chocolates bajo la marca “**Chocolates Menier**”, y muy recientemente sus semillas son transformadas en **Alemania** por la empresa **Ritter Sport**. Razón por la cual a partir del 2005 este cultivo crece en importancia y extensión muy rápidamente; además, el cacao es parte de la bebida más popular de Nicaragua (El Pinol), por la cual se conoce a los nicaragüenses, en centro América, como pinoleros.

El cacao se desarrolla bien bajo sombra, sus exigencias climáticas y de suelo son temperaturas comprendidas entre 18 °C y los 32 °C, suelos ricos en materia orgánica, profundos, francos arcillosos, con buen drenaje y topografía regular con pH 6.5, precipitación de 1500 a 3000 mm en las zonas bajas y cálidas, y de 1000 y 1500 mm en las zonas más frescas o de mayor elevación con respecto al nivel del mar.³

Al considerar estas exigencias de clima y suelo del cultivo de cacao, Nicaragua, posee 3.2 millones de hectáreas apropiadas para establecer plantaciones (Figura 1.1.a). El problema es que estas áreas están en zonas de mayor pobreza del país (en la Figura 1.1.b la zona es indicada en color rojo).

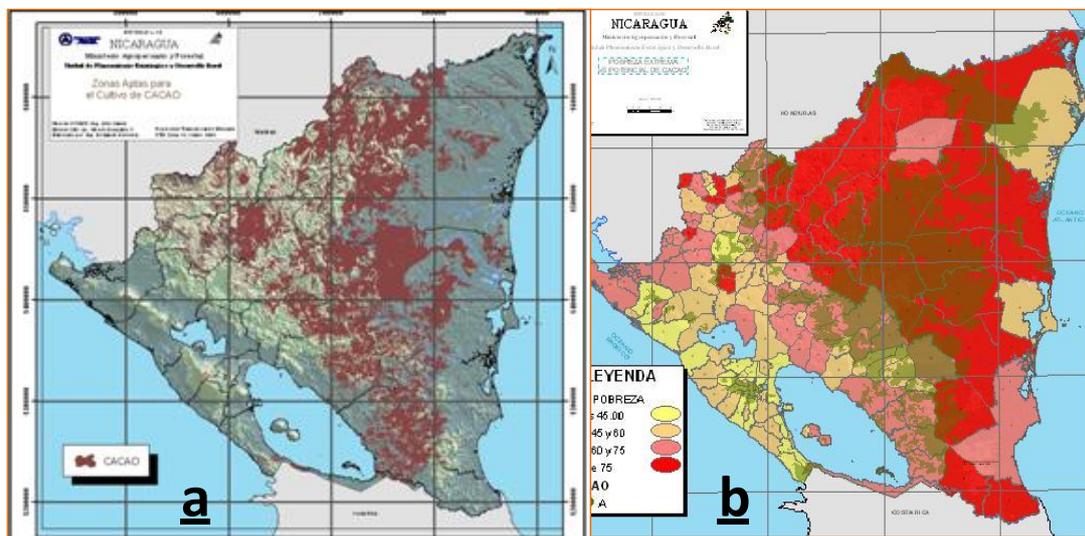


Figura 1.1. (a) Mapa de Nicaragua, geo-referenciado con el potencial edafoclimático del cultivo de cacao y (b) potencial edafoclimático del cultivo de cacao en zonas de pobreza, Elaborado por la Unidad de planeamiento estratégico y desarrollo rural UPDR. MAGFOR.

En zonas de pobreza los agricultores e instituciones se enfocan en actividades de rápido retorno como los granos básicos y hortalizas, razón por la cual algunos productores han abandonado las plantaciones. Actualmente, los productores que mantienen la producción de cacao en Nicaragua son aquellos cuyos ingresos familiares esta diversificados, que no dependen únicamente del cacao y realizan otras actividades productivas como la ganadería, caficultura, etc.

Por tanto, el reto para las cooperativas de productores y las instituciones que fomentan el cultivo está no solo en el fomento del cultivo si no también en la mejora de la productividad de las plantaciones y la calidad de la semilla, que permita mejor precio transfiriendo beneficios directos al productor en zonas de mayor potencial y pobreza. Esto sería posible, en parte, con la implementación de mejores técnicas pos-cosecha como el fermentado y secado de la semilla.

Para determinar la calidad de la semilla de cacao mediante la cuantificación de polifenoles y actividad antioxidante existen numerosas técnicas y métodos ⁴, que

pueden complementar otro tipo de valoraciones, como las sensoriales, que son las que exclusivamente se emplean en los centros de acopio de cacao en Nicaragua, ambos métodos podrían describir mejor los potenciales beneficios de esta semilla ⁵

La semilla de cacao se consume principalmente en países desarrollados bajo la forma de derivados como el chocolate, polvo de cacao y licor de cacao, la razón principal es que estos países cuentan con tecnologías adecuadas para el procesamiento de la semilla ⁶. Por su alto contenido en polifenoles esta semilla podría constituirse en una fuente importante para enriquecer alimentos ⁷, sin embargo hay que mejorar los procesos pos cosecha para conservarlos.

Los polifenoles en la semilla de cacao son los responsables de la calidad pero también del amargor y astringencia que la caracteriza en su estado natural, razón por la cual se somete a una serie de procesos en las que destacan el fermentado y el tostado de la semilla, necesarios para lograr desarrollar las características organolépticas apropiadas en cada derivado ⁸

En el cuerpo humano una vez ingeridos los polifenoles (por medio de diversos derivados como el chocolate) son digeridos y pasan a formar parte de la sangre aumentando la **capacidad antioxidante** en nuestro organismo. De esta forma las células del cuerpo se ven beneficiadas por la acción de estas sustancias que absorben el impacto que los radicales libres pueden tener en el organismo reduciendo el riesgo de contraer diversas enfermedades como las de tipo cardiovascular ⁹

Por tales razones, en el presente trabajo se plantea como objetivo cuantificar los cambios en la composición polifenólica y actividad antioxidante de muestras de cacao nicaragüense, con métodos relativamente sencillos y de bajo coste como el clásico Folin-Ciocalteu, que permite la cuantificación de polifenoles totales y el DPPH para estimar la actividad antioxidante.

Los resultados facilitarían orientar proyectos para mejorar el proceso de fermentado entre las cooperativas de productores de cacao e incluso entre los ONGs que fomentan el establecimiento de este cultivo mediante capacitación en técnicas de cultivo y pos cosecha a los productores.

1.2. Breve historia y características de las semillas de cacao

La semilla de cacao proviene de un árbol del mismo nombre; **El cacao**, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao L*, pertenece al orden *Malvales* y a la familia de las *Malvaceae*.¹⁰ En su desarrollo este árbol alcanza alturas que van de 3 a 8 metros, aunque por interés fitotécnico (para facilitar la poda de regulación de sombra y la cosecha) se mantiene a alturas menores de 3 a 4 metros.

Las semillas vienen dentro de los frutos o bayas que se forman sobre el tronco y en las ramas (Figura 1.2), con forma de mazorca de unos 15 a 25 centímetros de largo, y recién cosechadas son blancas ovoides (Figura 1.3) y pueden contener de 20 a 40 granos, una vez fermentadas o secas son de color pardas (Figura 1.4)



Figura 1.2. Fruto que contiene las semillas de cacao



Figura 1.3. Semilla del cacao recién cosechada



Figura 1.4. Semilla seca del cacao

La superficie de la mazorca es rugosa y por lo general se caracteriza por cinco surcos profundos a lo largo, al madurar toman diferentes colores que van del rojo al anaranjado y del morado al marrón. Cada planta llega a su madurez a los 12 años y pueden vivir entre 25 y hasta 50 años.

El nombre cacao deriva de la palabra azteca “cacahualt”, que significa jugo amargo y el de chocolate deriva de la palabra maya “chocol” y “a” que significan caliente y agua, respectivamente. Los botánicos, basados en las creencias de los mayas y aztecas, denominaron al cacao con el nombre científico de “*Theobroma cacao*”, que

significa en latín “alimento de los dioses”. El cacao era cultivado en América mucho antes de la llegada de los españoles, ahí los mayas y los mexicas elaboraban a partir de la semilla la bebida de nombre “*chocolatl*”, incluso fue utilizada como moneda en ese tiempo. De ahí es que se cree que el árbol de cacao (*Theobroma cacao L*) tiene como origen México.

De igual manera en Nicaragua el consumo de cacao es antiguo y actualmente frecuente por medio de la bebida típica nacional conocida por el nombre de Pinol; por la cual se conoce al nicaragüense como “Pinoleros”, y que incluye cacao en polvo (generalmente no fermentado y con poco tueste), maíz blanco 60%, y el cacao en la mezcla ronda el 35%, canela 3%, otras especies como el comino 2%, aunque estas proporciones y mezclas varía de acuerdo a la receta familiar.

Es tanta la cultura de consumo y el valor de esta semilla, que en ese país de centro América (Nicaragua) aun existen lugares como “Waslala” en la que se practica el trueque de la semilla de cacao por productos varios, lo anterior se pudo constatar durante el desarrollo de actividades investigativas sobre el cultivo en 2005, de parte del ministerio agropecuario y forestal de Nicaragua (MAGFOR).

Hoy en día este cultivo se desarrolla bien entre los 20 grados de latitud norte y 20 grados de latitud sur, en países de África, América Central, Sur América, Asia y Oceanía, donde se establecen plantaciones principalmente de tres grandes variedades: el criollo, el forastero y trinitario. Estas variedades aunque poseen similares concentraciones de polifenoles totales ¹¹, generan diferencias en la calidad del producto final, debido al impacto de los procesos pos cosecha en la concentración de estos compuestos^{12, 13, 14},

La semilla de la variedad trinitario son especialmente empleados para mezcla con otras variedades y dan origen al conocido chocolate oscuro, considerado uno de los mayores contribuyentes de antioxidantes en la dieta americana, después de las frutas y verduras, esto debido a la concentración natural de polifenoles que se encuentran en la semilla y que posteriormente son encontrados en sus derivados, aun después de los procesos post cosecha a la que es sometida la semilla ¹⁵. Sobre los polifenoles existe abundante evidencia de que intervienen en varios procesos bioquímicos y fisiológicos del cuerpo humano, mejorando el flujo de la sangre dentro del organismo ¹⁶, e incluso previniendo enfermedades como el alzhéimer y párkinson ¹⁷

1.3. Variedades de semilla de cacao

Las tres grandes variedades que generan la producción mundial de cacao son; *El Criollo*, *el Forastero* y *El trinitario*. El factor variedad tiene relación directa con el tiempo requerido para la fermentación, además influye en la calidad de los derivados. La variedad de cacao criollo es usada para elaborar los chocolates más finos del mercado mundial, en esta semilla el tiempo de fermentado es de 3 días y para el resto de variedades es 7 días ¹⁸, las características son las siguientes;

1.3.1. Cacao criollo o nativo

Este cacao es conocido como el cacao genuino, bautizado así por los españoles al llegar a México. Se cultiva actualmente en América en países como Perú, Venezuela, Honduras, Colombia, Ecuador, Guatemala, Trinidad, Bolivia, México , Granada y Nicaragua ¹⁹. El criollo es reconocido como de gran calidad, de escaso contenido en tanino, reservado para la fabricación de los chocolates más finos. Su mercado principal es el Japón.²⁰



Figura 1.5 Fenotipo del fruto de cacao de la variedad Criollo

1.3.2 Cacao forastero

El forastero es originario de la alta Amazonia, se trata de un cacao con el tanino más elevado. Proviene normalmente de África donde se han desarrollado muchos híbridos ²¹. El grano tiene una cáscara gruesa, es resistente y poco aromático. Para neutralizar sus imperfecciones, requiere de un intenso tueste, de donde proceden el sabor y el aroma a quemado de la mayoría de los chocolates. Los mejores productores usan granos forasteros en sus mezclas, para dar cuerpo y amplitud al chocolate, pero la acidez, el equilibrio y la complejidad de los mejores chocolates que se obtienen con esta variedad provienen de mezclas con la variedad criolla.



Figura 1.6. Fenotipo del fruto de cacao. Variedad Forastero

1.3.3 Cacao trinitario

Entre las semillas de cacao híbridos destaca el trinitario. Como su nombre sugiere, es originario de Trinidad de donde surgió como resultado de un proceso de cruce entre el forastero y el criollo.²² Así heredó la robustez del cacao forastero y el delicado sabor del cacao criollo, se usa también normalmente mezclado con otras variedades, aunque su calidad es más próxima al forastero presenta similares o mayores concentraciones de polifenoles que las anteriores variedades. Los híbridos representa el 95% de la producción mundial^{11, 23}



Figura 1.7. Fenotipo del fruto de cacao. Variedad Trinitario. (Fotos tomadas en 2006, de plantaciones de cacao en Waslala, Norte de Nicaragua).

1.4. Derivados de la semilla de cacao

La industria obtiene la semilla de cacao de los exportadores en dos posibles estados, 1. Semilla de cacao secas y 2. Semillas de cacao fermentadas y secas, para posteriormente someterlas a variados procesos industriales como bien ilustra la Figura 1.8, en la que básicamente procuran la calidad organoléptica de los derivados, lo que logran disminuyendo las concentraciones naturales de polifenoles mediante el tostado, alcalinizado, además de agregar otros ingredientes.

El proceso de alcalinización puede llevarse a cabo durante el procesamiento de los granos de cacao, es opcional al tostado. Durante este proceso, una sal alcalina disuelta en agua es utilizada, generalmente carbonato de potasio o carbonato de sodio, para neutralizar los ácidos y alterar el grado de pH en las almendras de cacao. El resultado de este proceso de alcalinización de los granos de cacao es oscurecer el cacao, así como suavizar su sabor e incrementar su solubilidad.²⁴

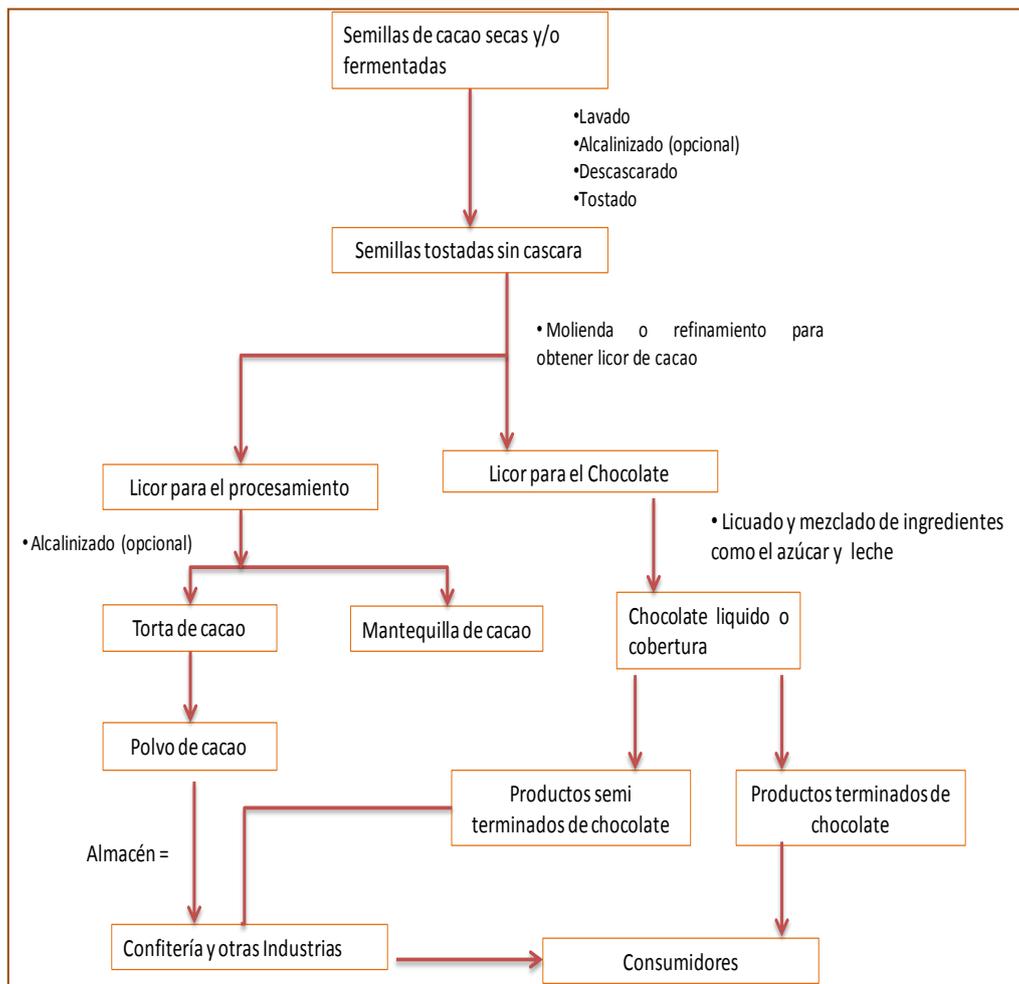


Figura 1.8. Diagrama industrial del proceso de elaboración de derivados.

Si el licor de cacao o la torta de cacao son sujetos a la acción del agua sin la sal alcalina disuelta, en el proceso de desacidificación se lleva a cabo una reacción sin obtener un cambio muy marcado en el pH. Por tanto existe una tendencia a producirse tonalidades ligeramente más rojizas de las que normalmente se obtienen de cacao en polvo naturales o cacaos en polvo sin alcalinizar. Actualmente las investigaciones se enfocan en mejorar diversos procesos de producción para conservar mayores cantidades de polifenoles en la semilla, sin alterar el sabor, y olor característico de los diversos derivados^{25, 26, 27}.

Manteca de cacao

Es la grasa obtenida de someter la masa o licor de cacao a presión y calor. Manteca de cacao natural líquida o sólida de color amarillo pálido, proveniente de una mezcla de finos cacaos de primerísima calidad, grano fermentado. En estado fundido, es un líquido oleoso, absolutamente límpido. También llamado aceite de theobroma, es la grasa natural comestible de la semilla del cacao, extraída durante el proceso de fabricación del chocolate y el polvo de cacao. La manteca de cacao solo tiene un suave aroma y sabor a chocolate. Es el único componente del cacao apropiado para la producción de chocolates blancos, helados, fabricación de cosméticos y farmacéuticos.



Figura. 1.9. Manteca de Cacao

Polvo de cacao

Es un polvo seco, de color café oscuro o bien claro, que tiene el sabor característico del cacao. No es amargo o ácido y es libre de impurezas, olor o sabores extraños. Conveniente para helados, leche, galletas, coberturas, chocolate para bebidas en polvo, confección de repostería.



Figura 1.10. Polvo de cacao

Licor de Cacao

La masa de cacao es el cacao finamente molido, se compone más de la mitad de su peso de cacao en polvo (53%) y el resto es manteca de cacao (17%) y diversos otros elementos como taninos. Por regla general la masa de cacao es uno de los primeros pasos en la elaboración de diversos subproductos es utilizado como cobertura o bien en la elaboración de chocolate. El proceso de separación de la masa del cacao y de la manteca, suele realizarse con el proceso Broma. El proceso Broma es un procedimiento

empleado en la elaboración del chocolate que consiste en la extracción de la manteca del cacao de la masa del cacao, dejando libre el cacao puro (cacao en polvo). El nombre proviene de la simplificación del (*Theobroma cacao*) fruto del árbol del cacao ¹⁸. La masa del cacao o licor de cacao al igual que el chocolate es sólido a temperatura ambiente, pero líquido por encima de los 35 °C ²⁸.



Figura 1.11. Molido del cacao para obtención del licor

Chocolate

El chocolate es el alimento que se obtiene mezclando azúcar con dos productos derivados de la manipulación de las semillas del cacao: una materia sólida (la pasta de cacao) y una materia grasa (la manteca de cacao). A partir de esta combinación básica, se elaboran los distintos tipos de chocolate, que dependen de la proporción entre estos elementos y de su mezcla o no con otros productos tales como leche y frutos secos, etc. Entre los chocolates destacan:

El Chocolate negro (llamado también chocolate fondant; amargo; bitter; puro): es el chocolate propiamente dicho, pues es el resultado de la mezcla de la pasta y manteca del cacao con azúcar, sin el añadido de ningún otro producto (exceptuando el aromatizante y el emulsionante). Las proporciones con que se elabora dependen del fabricante.

No obstante, se entiende que un chocolate negro debe presentar una proporción de pasta de cacao superior, aproximadamente, al 50% del producto, pues es a partir de esa cantidad cuando el amargor del cacao empieza a ser perceptible. En cualquier caso, existen en el mercado tabletas de chocolate negro con distintas proporciones de cacao, llegando incluso hasta el 99%.



Figura 1.12. tableta de chocolate negro (oscuro)

Chocolate de cobertura: es el chocolate que utilizan los chocolateros y los pasteleros como materia prima. Puede ser negro o con leche, pero en todo caso se trata de un chocolate con una proporción de manteca de cacao de alrededor del 30%, lo que supone el doble que en los otros tipos de chocolate. La cobertura se usa para conseguir brillo.



Figura 1.13. Repostería con cobertura

Chocolate a la taza: es el chocolate negro (proporción de cacao inferior al 50%), al que se le ha añadido una pequeña cantidad de fécula (normalmente, harina de maíz) para que a la hora de cocerlo aumente su espesor. Suele disolverse en leche. Hoy en día, es posible encontrar también este chocolate en los comercios en forma ya líquida.



Figura 1.14. Chocolate a la taza

Chocolate con leche: es el derivado del cacao más popular. Se trata, básicamente, de un dulce, por lo que la proporción de pasta de cacao suele estar por

debajo del 40%. No obstante, gran parte de las importantes marcas producen tabletas de chocolate con leche con proporciones de cacao inusuales, por encima incluso del 50%, dirigidas tanto al mercado de los gourmet como al negocio de la pastelería. El chocolate con leche, como su nombre indica, lleva leche condensada como relleno.



Figura 1.15. Chocolate con leche

Chocolate blanco: estrictamente, no se trata de chocolate, pues carece en su composición de la pasta de cacao (Figura. 1.16.), que es la materia que aporta las propiedades del cacao. Se elabora con manteca de cacao (por lo menos, el 20%), leche (en polvo o condensada) y azúcar. Es un producto extremadamente energético y dulce. Visualmente muy atractivo, es un elemento decorativo muy usado en la repostería. **Chocolate relleno:** como indica la expresión, es una cubierta de chocolate (en cualquiera de sus variantes y con un peso superior al 25% del total) que recubre frutos secos (avellanas, almendras...), licores, frutas, etc. Figura. 1.17.



Figura 1.16. Chocolate blanco



Figura 1.17. Chocolate de cobertura o relleno

Aunque los derivados anteriormente mencionados sostienen e incluso incrementan su demanda comercial a nivel mundial, la industria procura constantemente mejorar las propiedades reológicas de los derivados estudiando la interacción y sustitución de ingredientes específicos manteniendo o mejorando el valor nutritivo.²⁹

1.5. Producción y consumo del cacao

La producción mundial de semilla de cacao se desarrolla en ocho países, que por orden descendente de producción son; **En África**. Costa Marfil, Ghana, Nigeria y Camerum, de **América**; Brasil y Ecuador, y de **Asia y Oceanía**; Indonesia y Papiua Nueva Guinea, la producción de estos países representan el 90% del total mundial, como muestra la Tabla 1. 1.

Tabla 1.1. Producción de granos de cacao en el mundo, expresado en 10⁸ kg (Elaboración propia con datos de IICO, 4º Boletín estadístico: producción de semilla cacao (30.11.11).

País/Continente	2008/09	%	2009/10	%	2010/11	%
África	25,2	70.0	24,83	68.4	31,80	74.8
Costa de Marfil	12,2		12,42		15,11	
Ghana	6,62		6,32		10,25	
Nigeria	2,50		2,35		2,40	
Camerún	2,24		2,05		2,30	
Otros	1,57		1,68		1,75	
América	4,78	13.3	5,17	14.2	5,40	12.7
Brasil	1,57		1,61		2,00	
Ecuador	1,35		1,50		1,45	
Otros	1,86		2,06		1,95	
Asia & Oceanía	5,98	16.6	6,32	17.4	5,30	12.5
Indonesia	4,90		5,50		4,40	
Papua Nueva Guinea	0,59		0,39		0,45	
Otros	0,48		0,44		0,45	

Empero, a pesar de que el cacao se produce en países en desarrollo el consumo es principalmente en países desarrollados de América, Europa y Asia, en donde los importadores son a la vez los transformadores de la semilla en los diversos derivados. Son pocas compañías, sobre todo multinacionales, las que dominan tanto la transformación como la producción de chocolate, utilizando para ello variados y sofisticados procesos industriales.

Entre los derivados de la semilla de mayor demanda entre los consumidores están el cacao en polvo, chocolate blanco y chocolate oscuro. La tabla 1.2 muestra a los principales consumidores de cacao, y su estimación se basa en el consumo doméstico aparente de cacao, que a su vez se calcula sumando las moliendas a las importaciones

netas de productos de cacao; entre ellos chocolate en polvo (cacao molido y parcialmente desgrasado), chocolate blanco (grasa de chocolate) y chocolate oscuro, equivalente en granos.

Tabla 1.2. Principales consumidores de cacao en el mundo, expresado en 10⁸ kg (Elaboración propia con datos de IICO, 4º Boletín estadístico: consumo de semilla cacao molienda y productos derivados (30.11.11)).

País/Continente	2008/09	%	2009/10	%	2010/11	%
Europa	14,56	41.50	15,09	40.60	15,93	41.20
Alemania	3,42		3,61		4,39	
Holanda	4,70		5,15		5,35	
Otros	6,44		6,33		6,19	
África	6,22	17.70	6,85	18.40	6,40	16.60
Costa de Marfil	4,19		4,11		3,60	
Ghana	1,33		2,12		2,20	
Otros	0,70		0,61		0,60	
América	7,80	22.20	8,15	21.90	8,52	22.00
Brasil	2,16		2,26		2,39	
Estados Unidos	3,61		3,82		3,97	
Otros	2,03		2,07		2,15	
Asia & Oceanía	6,55	18.60	7,08	19.00	7,82	20.20
Indonesia	1,20		1,30		1,75	
Malasia	2,78		2,98		3,05	
Otros	2,56		2,80		3,02	
Total Mundial	35,12	100	37,17	100	38,67	100
Molienda inicial	14,19	40.40	15,27	41.10	15,59	40.30

1.6. Polifenoles y antioxidantes de la semilla de cacao

El creciente interés sobre los polifenoles ha incentivado el estudio de su concentración natural en plantas y frutos y los factores que le impactan, debido en parte a sus propiedades funcionales como antioxidantes. En la semilla de cacao los polifenoles se encuentran en la cascara³⁰ y en el cotiledón, el cual se caracteriza por el color violeta intenso, color relacionado con polifenoles específicos como las catequinas y antocianinas³¹. Los polifenoles en la semilla de cacao constituyen aproximadamente entre el 8% y el 10% del peso seco de la semilla.^{32, 33}

Aunque en la semilla de cacao se encuentran diversos compuestos como se ilustra en la Figura 1.18, los de interés son aquellos que pertenecen a los flavonoides (p.ej., catequinas) compuestos que han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica en el hombre³⁴, que al consumirlos a través de vegetales o derivados como el chocolate, ejercen funciones anti inflamatorio, antioxidantes y por tanto preventivas ante diversas enfermedades como las del tipo cancerígenas³⁵

<u>Compuesto</u>	(%) de compuestos polifenólicos en la célula almacenadora	(%) de compuestos polifenólicos en los cotiledones
Catequina	25,0	3,0
Proantocianidina	21,0	2,5
Polímeros de Proantocianidina	17,5	2,1
Antocianinas	3,0	0,4
Fenoles totales	66,5	8,0
Teobromina	14,0	1,7
Cafeína	0,5	0,1
Azúcares libres	1,6	-
Polisacáridos	3,0	-
Otros	14,4	-



Figura 1.18. Porcentaje de compuestos polifenólicos en los cotiledones de la semilla fresca de cacao.

Elaboración propia usando como fuente^{36, 32},

Se estima que del total de polifenoles en esta semilla, el 60% son flavanoides (monómeros individuales: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas; y procianidinas: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas condensadas.³⁷ y, aunque actualmente estos compuestos son objeto de mucha investigación, existe consenso sobre su efecto antioxidante y su influencia en varios procesos bioquímicos y fisiológicos del ser humano³⁸

1.6.1 Subdivisión de los polifenoles

La subdivisión de los polifenoles deriva de las diferencias en su estructura sobre todo del anillo central. Los radicales unidos al anillo central y en el caso de los taninos el grado de polimerización y el tipo de monómeros que lo conforman. Desde el punto de vista químico los compuestos fenólicos son caracterizados por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos (Figura 1.19).

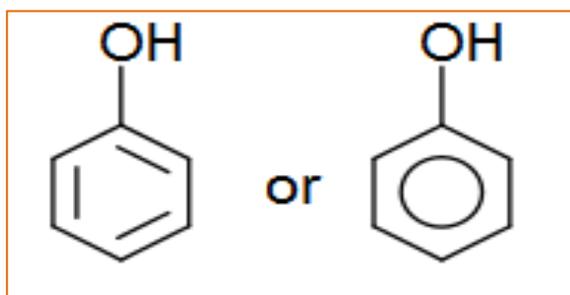


Figura 1.19. Estructura Química de los Fenoles.

Su clasificación está basada sobre la distinción entre los compuestos no flavonoides y flavonoides. Estos últimos tienen un esqueleto C6-C3-C6. Los compuestos no flavonoides se dividen en ácidos benzoicos (C6-C1) y los ácidos cinámicos portadores de una cadena lateral insaturada (C6-C3). En la Figura 1.20. se aprecian dos ejemplos de estos compuestos ³⁹

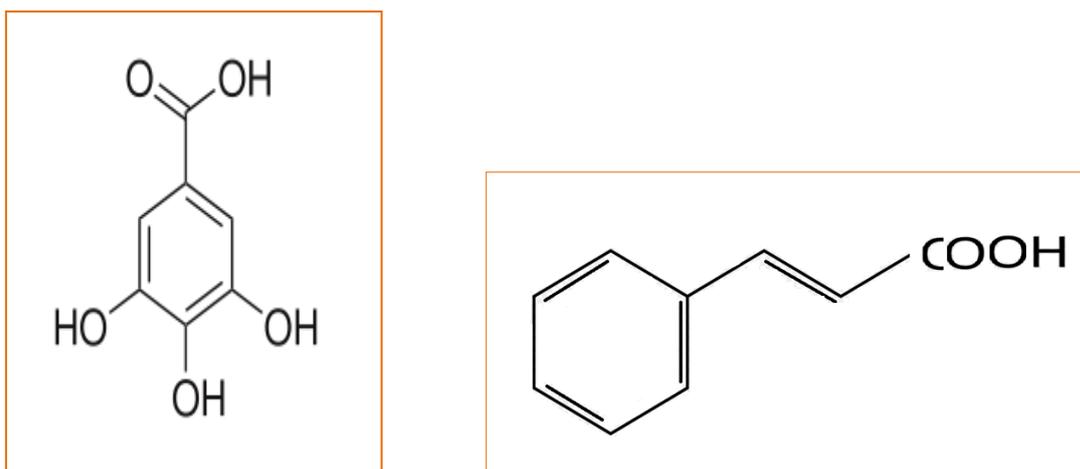


Figura 1.20. Estructura química del ácido gálico (Izq.) y del ácido cinámico (Der.)

En cuanto a los flavonoides se refiere (término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas) la estructura básica de éstos se representa bien en la Figura 1.21.

Su clasificación se basa en las diferencias estructurales que presenta la cadena central como ilustra la Figura 1.22. Estos compuestos presentes en la semilla de cacao, también se encuentran en los hollejos, semillas y raspones de la uva ⁴⁰

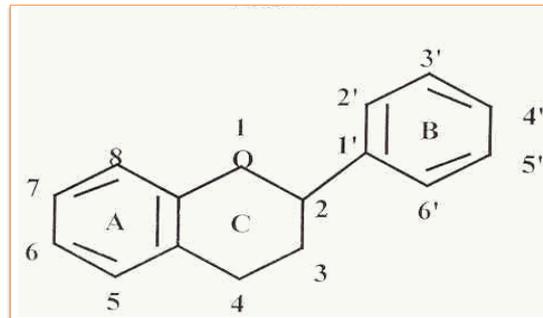


Figura 1.21. Estructura básica de los flavonoides, sin sustituyentes.

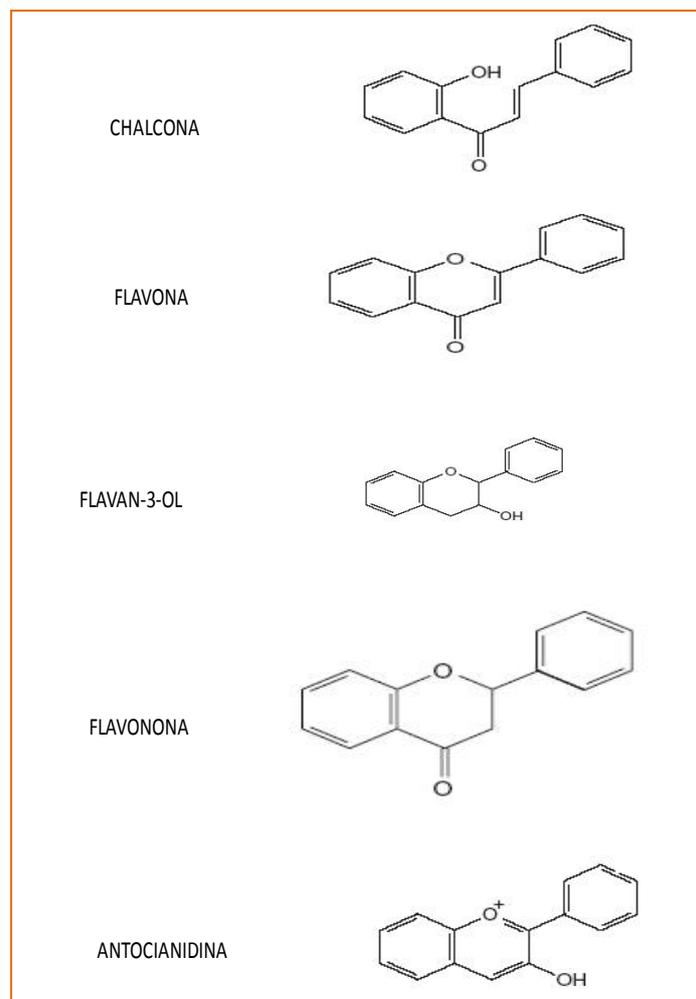


Figura 1.22. Clasificación estructural básica de los diferentes flavonoides ⁴⁰

1.6.2 Taninos

Los taninos son compuestos de alta masa molecular (entre 500 y 5000 Da) y contienen suficientes grupos hidroxifenólicos como para permitir un entrecruzamiento estable con proteínas. El término taninos viene de la palabra “tan” que en inglés significa curtir pieles, siendo este el uso original que se les dio a estas moléculas en la fabricación de artículos de piel⁴¹. Los taninos se pueden dividir en dos grandes grupos:

1. Los taninos condensados son el grupo más ampliamente distribuido entre los metabolitos secundarios de las plantas. Los taninos condensados también son llamados proantocianidinas por su capacidad de formar cianidinas tras una hidrólisis ácida. La mayoría de ellos son cadenas oligoméricas o poliméricas de catequinas, cadenas de leucoantocianidinas o cadenas de flavonoles. Si bien el proceso de creación de los compuestos fenólicos monoméricos está bien identificado, los pasos que conllevan a la condensación y polimerización de los monómeros para formar los taninos aún no están del todo dilucidados.⁴²

2. De los taninos hidrolizables cuyas estructuras químicas pueden apreciarse en la Figura 1.23, en su mayoría contienen un núcleo de glucosa o algún alcohol esterificado unido a un ácido gálico (como los galotaninos) o unido a un ácido hexahidroxifenólico (como los elagitaninos)

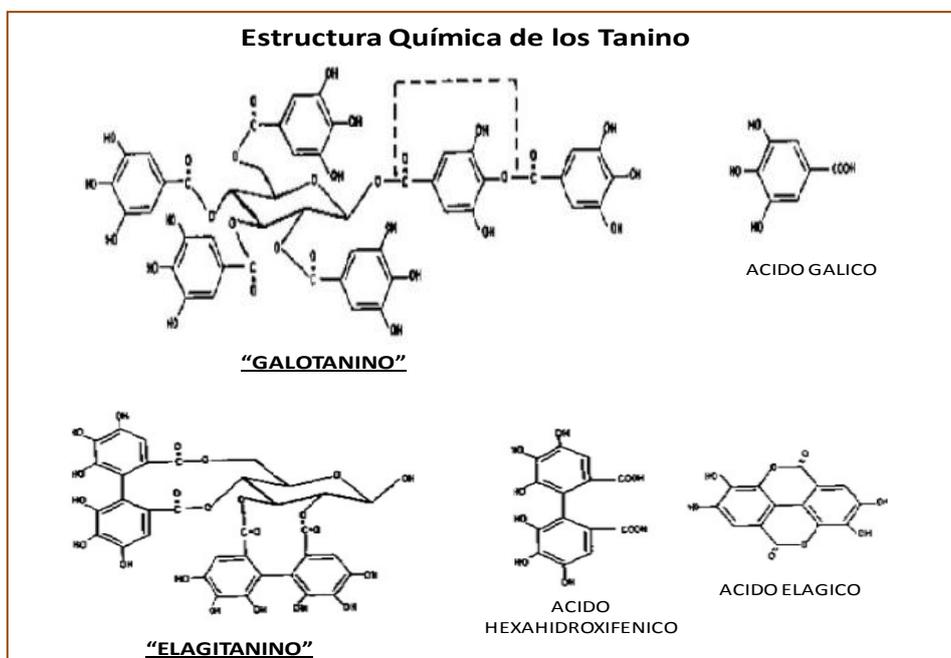


Figura 1.23. Estructuras químicas de los taninos. Ejemplo de un “GALOTANINO” y de un “ELAGITANINO”

1.6.3. Función de los Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una molécula que pierde un electrón y por lo tanto se oxida a otra que gana el electrón y por lo tanto se reduce. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los radicales se producen durante la respiración con la presencia de oxígeno que aunque es imprescindible para la vida celular de nuestro organismo, también induce la formación de éstas moléculas reactivas, que provocan a lo largo de la vida efectos negativos para la salud debido a su capacidad de alterar el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos o grasas "oxidación"

En el transcurso de los años, los radicales libres pueden producir una alteración genética sobre las células que se dividen continuamente contribuyendo a aumentar el riesgo de cáncer por mutaciones genéticas o bien, disminuyen la funcionalidad de las células que no se dividen tanto, disminuyendo el número de mitocondrias, que es característico del envejecimiento. En nuestro cuerpo existen células que se renuevan continuamente como las células de la piel, del intestino, y el hígado, y otras sin capacidad de renovación como las neuronas.

Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes como los polifenoles son a menudo agentes reductores y ejercen funciones preventivas (neuroprotectoras) contra enfermedades tan importantes como las coronarias y otras igualmente temidas como el hombre como el Alzheimer y Parkinson, que se caracterizan particularmente por la disminución de la funcionalidad de células cerebrales⁴³

Las concentraciones de antioxidantes que se encuentran en la semilla de cacao - flavanóides [(monómeros individuales: (+)-catequinas y (-)-epicatequinas) y procianidinas ((+)-catequinas y (-)-epicatequinas condensadas)] dependen de varios factores, pero principalmente de los procesos pos cosecha a la que es sometida la semilla durante la elaboración de derivados. Esto es debido a que los procesos pos cosecha tienen como principal objetivo el perfil organoléptico de los derivados como el chocolate, no obstante, este derivado conserva importantes concentraciones de compuestos con poder antioxidantes, importante en la salud humana⁴⁴

1.7. Procesos que impactan la concentración polifenólica de la semilla de cacao: fermentado y tostado de la semilla.

Aunque en la concentración de polifenoles de la semilla de cacao tiene influencia el estado de madurez fisiológico del árbol, el origen del cultivo (convencional y ecológico), los sistemas de fertilización, y la variedad, son los procesos post cosecha de fermentado y tostado de la semilla los principales factores que afectan la concentración natural de estos biocompuestos, en el largo proceso a la que es sometida esta semilla para obtener sus derivados ^{7b}

1.7.1. Fermentación de la semilla de cacao

Una vez cosechado el fruto de cacao el proceso de fermentado inicia con la extracción de la semilla (ilustrada anteriormente en la figura 1.3), para ello se parte el fruto con objetos de madera como se muestra en la Figura 1.24, procurando no hacer daño a las semillas durante este proceso. Cuando se parte el fruto con herramientas no apropiadas al propósito (p. ej., el machete), es casi imposible medir la fuerza necesaria para partir únicamente el fruto sin dañar la semilla a como muestra la Figura 1.25., y comprometer el efecto del proceso de fermentado en la semilla.



Figura 1.24. Partido de la fruta de cacao **apropiado** para extracción de las semillas.



Figura 1.25. Partido de la fruta de cacao **no apropiado** para extracción de las semillas.

La fermentación básicamente es un proceso espontáneo de carácter bioquímico que se caracteriza por la sucesión progresiva de microorganismos (especies de hongos filamentosos, levaduras, bacterias ácidas lácticas y bacterias ácidas acéticas) entre la

masa de semillas en fermentación, estos microorganismos son activados por el cambio de temperatura entre la masa en fermentación, proceso que dura un mínimo de 3 días y un máximo de 7 días, tiempo durante el cual los polifenoles se oxidan bajando su concentración inicial. y provocan cambios en el color de la semilla ^{45, 46}, relacionados con cambios en la concentración inicial de antocianinas ⁴⁷

Los microorganismos encontrados en las semillas en fermentación son con frecuencia levaduras del género *Saccharomyces spp*, particularmente *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala* y *Schizosaccharomyces pombe* ⁴⁸, que provienen del medio ambiente circundante. Aunque ya se ha realizado la fermentación controlada, inoculando otras especies como las bacterias ácidas lácticas (*L. lactis* y *L. plantarum*) y bacterias de acetato (*Acetobacter aceti* & *Gluconobacter oxydans*) con similares resultados. ⁴⁹

Este proceso de fermentado se realiza dentro de cajones de madera (Figura 1.26), y en ocasiones en cajas de plástico, pero puede realizarse envueltas en hojas de plátanos en el suelo como muestra la Figura 1.27. El tiempo de fermentado a la que se somete la semilla depende de la variedad de la semilla, en la variedad criollo, conocido como cacao fino, el fermentado se realiza por tres días, en las variedades forastero y los híbridos como trinitario, la fermentación es de siete días ¹¹



Figura.1.26. Cajones de madera para fermentar semillas de cacao, tapados de diversas formas.

Figura 1.27. fermentación de semillas de cacao sobre el suelo con hojas de plátano

Empero, cualquiera que sea el método empleado siempre se deberá realizar volteos periódicos y oportunos a la masa de semillas en fermentación para que las fases

anaeróbicas y aeróbicas que se desarrollan en los 3 primeros días (Figura 1.28) realicen bien su función y la semilla no finalice amarga posterior al proceso.⁵⁰

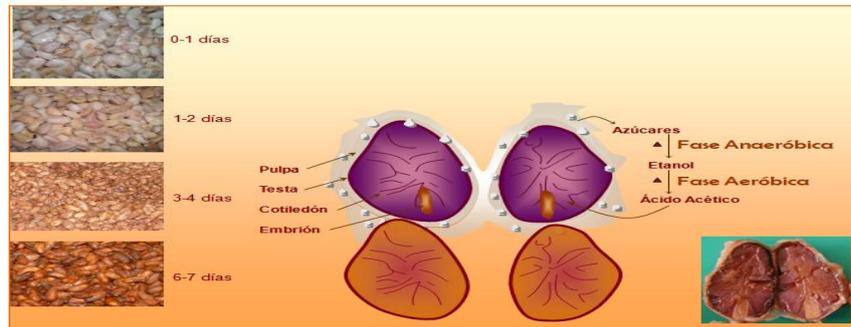


Figura 1.28. Fases de la fermentación de la semilla de cacao (Elaboración propia con datos de Camu, De Winter et al. 2008).

En Nicaragua algunos productores realizan el primer volteo al primer día de iniciado el proceso, otros lo realizan al segundo día. De ahí en adelante se realizan volteos periódicos generalmente al tanteo o por la experiencia, aunque hay quienes registran las temperaturas que las semillas en fermentación alcanzan como se muestra en la Figura 1.29, que van desde 30 °C el primer día a 50 °C a los 7 días.



Figura 1.29. toma de temperatura de las semillas en fermentación para proceder al volteo

Al final del proceso, algunas semillas retienen valores variados (máximos y mínimos) de polifenoles totales⁵¹, y específicos que confieren las diferencias en el sabor identificadas por algunos autores⁵², aunque las pérdidas continúan con la exposición de la semilla al secado, el cual puede ser en hornos calentados de diversas formas o al sol (Figura 1.30); la cronología completa del fermentado y secado se aprecia muy bien en la figura 1.31.



Figura 1.30. Secado al sol de semillas de cacao fermentadas

Secado

Volteos										
Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Horas	0	24	48	72	96	120	144	168	192	
Temperatura °C	33	34-36	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	45-50	
Prueba de corte										
			Muerte Del embrión 90 – 100%		Semilla arriñonada 40 %		Semilla arriñonada 60 %		Semilla arriñonada 80 %	

Figura 1.31. Cronología del fermentado de la semilla de cacao y secado al sol

Aunque en el pasado el objetivo principal del secado al sol era reducir la humedad de las semillas de forma que fueran estables durante el almacenamiento, en la actualidad esta fase a tomado importancia, pues se ha verificado la continuidad de las reacciones de oxidación iniciadas en la fermentación, y conllevando a la reducción del amargor, astringencia y acidez de la semilla.

Entre los indicadores de la eficiencia del secado esta la humedad remanente en la semilla, aproximadamente 7-8%. En lugares de abundante lluvias el secado de la semilla se realiza en hornos, eléctricos o calentados con leña como el mostrado en la Figura 1.32, sin embargo en términos organolépticos los resultados son menos favorables, dado que la acidez final de la semilla es mayor, comparado con el secado al sol.⁵³



Figura 1.32. Secado de semillas de cacao fermentadas en hornos calentado con leña

Al final del proceso los granos disminuyen hasta en una cuarta parte de su peso inicial y en las semillas cuyo proceso de fermentación fue correctamente realizado se evidencia la muerte del embrión, cambios de color en el cotiledón, y el desarrollo de hendiduras en el cotiledón, lo que puede observarse al realizar una prueba de corte para exponer el aspecto del cotiledón de la semilla, como se ilustra en la Figura 1.33.



Figura 1.33. Evidencias de cambios en la coloración del cotiledón durante la fermentación de la semilla de cacao. a) Semilla no fermentada, b) Semilla fermentada.

Sin embargo, el registro de los cambios bioquímicos internos solo es posible conocerlos mediante la cuantificación de los polifenoles totales en los extractos de la semilla. En términos gráficos y numéricos, el impacto de este proceso en la semilla puede apreciarse claramente en las figuras 1.34.

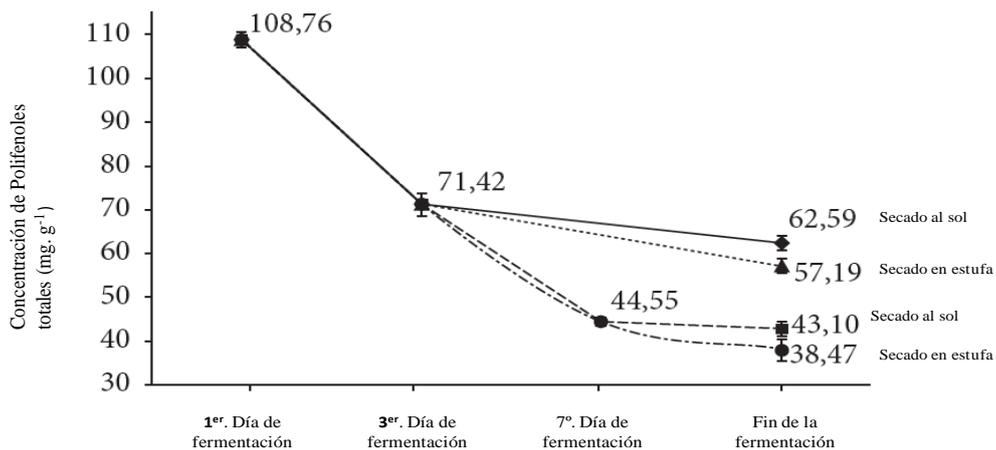


Figura 1.34. Grafico de pérdida de compuestos fenolicos totales en las semillas de cacao durante la fermentación (3 y 7 días) y al termino de secado natural y artificial.⁵⁴

De acuerdo la figura 1.34, la etapa de fermentación es responsable de la pérdida de polifenoles totales, la cual decrece de su estado inicial un 35% (71,42 mg.g⁻¹) hasta el tercer día y, un 59% (44,55 mg.g⁻¹) hasta el séptimo día de fermentación. Estas pérdidas que se acentúan ligeramente durante el secado, donde las diferencias son marcadas por sistema empleado. Se verificó que las semillas fermentadas por 3 días presentaron pérdidas de 19,1% secadas en estufa (57,19 mg.g⁻¹) y 10,8% secadas al sol (62,59 mg.g⁻¹) y que las semillas fermentadas por 7 días presentaron pérdidas de 11,6% secados en estufa (38,47 mg.g⁻¹) y un 2,8% secado al sol (43,10 mg.g⁻¹)^{54, 55}

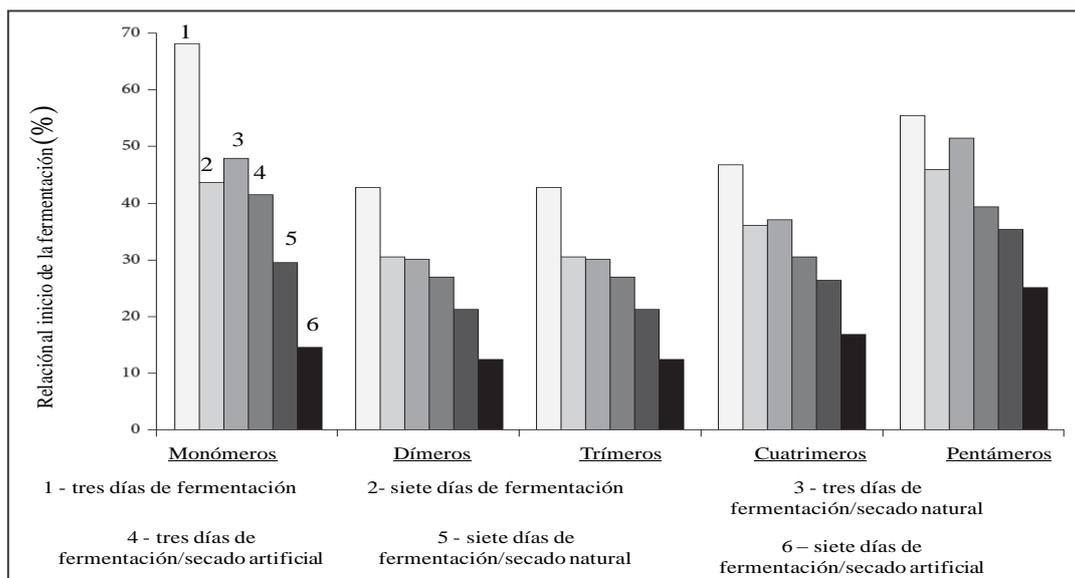


Figura 1.35. Cuantificación relativa de Flavonoides y procianidinas en semillas de cacao durante la fermentación y al término de secado. Adaptación en base a⁵⁴

Los polifenoles de estas semillas son relacionados con la actividad antioxidante, se cree que cuanto más elevado sea la cuantificación de polifenoles mayor la actividad antioxidante. Sin embargo, con el fermentado se pierde gran parte de los polifenoles de esta semilla⁵⁴, básicamente porque este proceso busca generar los precursores del sabor y el color característicos de los derivados como el chocolate. Como dato adicional, la degradación de los biocompuesto durante la fermentación es selectiva, y a diferencia de otros biocompuestos, las proteínas alcanzan su nivel más alto de pérdidas al tercer día de iniciado la fermentación, cuando registra hasta un 57% de pérdidas totales⁵⁶.

Lo anterior es muy importante porque la semilla de cacao una vez procesada (fermentada y tostada) es la principal materia prima en la elaboración de derivados de gran consumo en el mundo, como el chocolate o bien el polvo de cacao, que por el valor retenido de polifenoles o proteínas totales en la semilla podría determinar si dará origen a una deliciosa golosina o un alimento funcional.

1.7.2. Tostado de la semilla de cacao

La semilla de cacao llega a la industria para ser procesada (tostada, molida y mezclada con otros ingredientes, como la leche, azúcar, etc.) después de ser fermentada por el productor; aun con cascara, potencialmente contaminada (contaminación que suele suceder durante las fases de fermentado y secado cuando el operario entra en contacto con la semilla en un medio ambiente no controlado), y con concentraciones variadas de polifenoles, debido a la calidad del fermentado y secado de la misma.⁵⁴

Para su acondicionamiento las industrias establecen sistemas APPCC, garantizando la inocuidad durante la recepción, producción, almacenamiento y comercializando de derivados. La potencial contaminación en la semilla puede medirse por el crecimiento de levaduras⁵⁷, evitando su posible propagación a diversas zonas de la fábrica en donde la semilla de cacao una vez tostada, descascarada y molida, es mezclada con otros ingredientes que mejoran las características organolépticas de los derivados⁵⁸

El tostado es una operación de procesado del cacao muy importante que determina en gran medida el color, aroma y sabor de los derivados del cacao. Durante el tostado el color del cacao sufre un pardeamiento adicional al observado durante las etapas previas de fermentación y secado. En este pardeamiento participan múltiples

reacciones que como son oxidaciones y polimerizaciones de polifenoles, degradación de proteínas, y reacciones de Maillard. En cambio en aroma y sabor tiene especial influencia las diferentes temperaturas y tiempos a la que sea sometida la semilla durante el tostado ⁵⁹

Para el tostado de la semilla de cacao existen dos alternativas; *el tostado convencional*, y *el pre tostado*. El tostado convencional consiste en el tueste de las semillas aun con cascara en hornos industriales a temperaturas comprendidas entre 100 y 150 °C durante 15 o 45 minutos respectivamente ⁵⁹. En cambio el pre tostado, como su nombre lo indica, consiste en someter a las semillas a un tratamiento térmico previo a temperaturas inferiores de 100 °C, por cortos periodos de tiempo (15 minutos) para desprender la cascara de la semilla y posteriormente someterla de manera directa a otros niveles de temperatura o bien otros procesos ⁶⁰.

La selección del método adecuado de tostado fue determinado por su efectividad en alcanzar indicadores claves del proceso, tales como bajar la cuenta bacteriana, facilitar el descascarado y mejorar el color ⁶⁰, con temperaturas entre 110 °C y 150 °C ⁶¹ en la actualidad se siguen las misma pautas y se integran indicadores “ambientales” como la energía necesaria durante el proceso de tostado ⁶², para finalizar el desarrollo de los componentes del color, aroma y de sabor iniciados durante la fermentación ⁶³. Durante el tueste de la semilla a temperaturas menores se estima un 14% de perdidas en la concentración de polifenoles ⁶⁴.

En la industria el método más empleado es el *tostado convencional* bajo el sistema convectivo, que realiza el tueste de la semilla con cascara, con circulación o transmisión de aire caliente a temperaturas que oscilan entre 130 °C y 150 °C por 15 y 45 minutos. ⁶⁵ Temperaturas inferiores a 100 son menos empleadas por que prolongan el tiempo de aplicación incrementando los costos de producción de los derivados. Aunque se sabe que las temperaturas menores a 70 °C permitirían mayor retención de compuestos específicos como los flavonoides, que gozan de estabilidad durante el almacenamiento ⁶⁶, y que son de gran importancia por sus múltiples efectos en la salud de quien los consume mediante diversas fuentes. ¹⁷

La temperatura inicia sus efectos reduciendo la humedad de la semilla permitiendo la separación de la cascara al mismo tiempo inicia el desarrollo de los componentes del color y aroma, por ello algunos autores señalan a la temperatura como factor principal del cambio del color deseado en la semilla, sin embargo otros autores ⁶⁷

indican que la dinámica de la pigmentación característico de la semilla de cacao tostada (marrón oscuro), alcanza su mayor expresión a los 134 °C y disminuye si la temperatura sigue elevándose, la evidencia de lo anterior fue observada durante la reacción de Maillard, reportada por McWeeny.⁶⁸ Krysiak.⁶⁹ observó que a mayor temperatura de tostado mayor efecto de pardeamiento se observa en el color del cacao, determinado éste a partir del ratio de absorbancias de extractos de cacao a 460 y 525 nm (Figura 1.36).

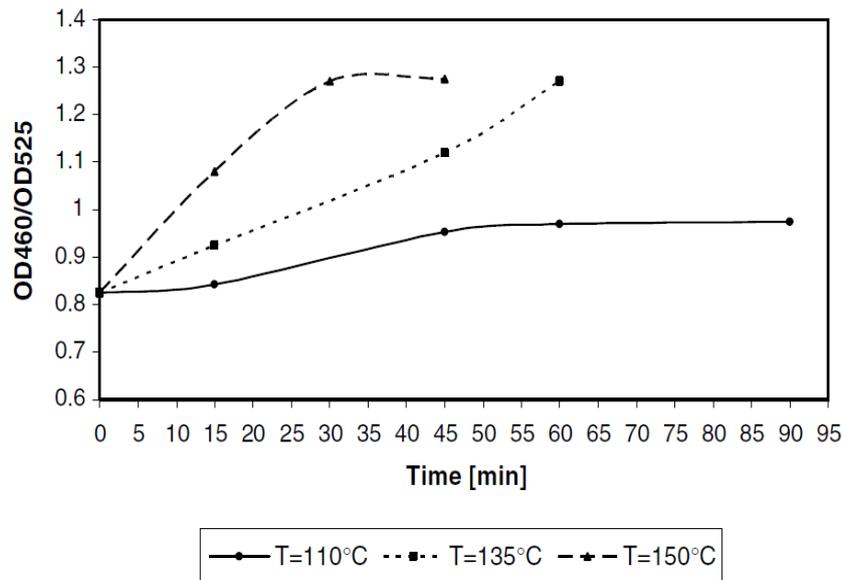


Figura 1.36. Evolución del ratio OD460/OD525 durante el tostado de cacao a distintas temperaturas⁶⁹

Sobre desarrollo de la fracción aromática ha sido puesto en evidencia que está en función de la variedad de cacao y el tratamiento pos cosecha (días de fermentación) y que el tipo de secado no es tan influyente⁷⁰, pero el tostado lo desarrolla aún más, al inducir a la formación de compuestos aromáticos que en su gran mayoría son del tipo de las pirazinas.⁷¹

1.8. Objetivos y plan de trabajo

Objetivos generales

El objetivo de este trabajo de investigación es estudiar el impacto de la fermentación y el tostado sobre la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante de semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), de la variedad trinitario, procedente de Nicaragua.

Objetivos específicos

- Caracterizar la concentración de polifenoles totales y la actividad antioxidante y el color de muestras de semillas de cacao fermentadas y sin fermentar de la variedad Trinitario procedentes de Nicaragua.
- Evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de tostado en la concentración de polifenoles totales, actividad antioxidante y color de dichas muestras.

Plan de trabajo

El trabajo de investigación implicó la realización de las siguientes actividades:

- Obtención de las muestras de cacao. La empresa Ritter Sport es la principal acopiadora de cacao de Nicaragua. La empresa donó tres muestras representativas de las categorías de cacao que habitualmente acopia: cacao sin fermentar y cacao fermentado de alta y de baja calidad.
- Revisión bibliográfica sobre el cacao, y en particular sobre su composición fenólica y actividad antioxidante.
- Puesta a punto de los métodos de desgrasado y posterior extracción de compuestos fenólicos.
- Análisis de las tres muestras de cacao en su estado inicial.
- Aplicación de los tratamientos de tostado y análisis de las muestras de cacao.
- Recopilación y análisis estadístico de los resultados
- Redacción de la memoria del trabajo de investigación.

Materiales y Métodos Experimentales

2.1. Muestras de cacao y diseño experimental

Muestras.

Las tres muestras de semilla de cacao utilizadas para la investigación provienen de Nicaragua, y son de una misma variedad (*Trinitario*) pero con tres características diferentes las cuales son: CSF) Cacao sin fermentar, CF-AC) Cacao fermentado alta calidad, y CF-BC). Las muestras contaban con certificados fitosanitarios de parte del Ministerio Agropecuario y Forestal de Nicaragua (anejo I), extendido por medio de la Dirección General de Protección y Sanidad Agropecuaria, (DGPSA) ubicado en el kilometro 4 carretera a la ciudad de Masaya en Nicaragua.

Aunque el origen de esta semilla es de cooperativas de productores de cacao en Waslala, se obtuvieron del centro nacional de acopio de cacao de la empresa alemana **Ritter Sport**, (anejo II- fichas de control de calidad) ubicada en Matagalpa, Nicaragua. Las características de cada muestra, las consideradas por el centro de acopio para clasificar el grado de fermentación o calidad de la semilla, se pueden observar mejor en el anejo III.

Diseño experimental.

En la tabla 2.1 se resume el diseño experimental correspondiente al tostado. En base a la bibliografía (Krysiak, 2006) se establecieron tres tratamientos de tostado para cada uno de las muestras de cacao, a temperaturas y tiempos distintos: 90 min a 110°C, 60 minutos a 130°C y 45 minutos a 150°C. En el tratamiento a 130°C se tomaron aplicaron tratamientos a tiempos intermedios (20 y 40 minutos).

En la tabla 2.2 se resume el número de extracciones y análisis (por cada método de análisis) realizados. En la caracterización inicial de los tres tipos de cacao se aplicaron cuatro repeticiones de la extracción. En cuanto al tostado, cada combinación tiempo-temperatura se aplicó dos veces, obteniéndose a continuación un extracto de cada una de las muestras tostadas. Todo esto dio lugar a la realización de un total de 38

extracciones. A continuación, para cada extracto se aplicaron 2 repeticiones de cada uno de los análisis, para dar un total de 76 análisis.

Tabla 2.1. Diseño experimental del tostado.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Muestras sometidas a tostado*
110	90	CSF,CF-AC, CF-BC
130	60	CSF,CF-AC,CF-BC
130	40	CF-AC,CSF
130	20	CF-AC,CSF
150	45	CSF,CF-AC, CF-BC

*CSF, cacao sin fermentado. CF-AC, cacao fermentado alta calidad.

CF-BC, cacao fermentado baja calidad,

Tabla 2.2. Cuadro de extracciones y análisis realizados durante el trabajo experimental

Cacao Tipo	CSF		CF-AC		CF-BC		Total	
	Ext.	An.	Ext.	An..	Ext.	An.	Ext.	An.
Inicial	4	8	4	8	4	8	12	24
Tostado 110°C	2	4	2	4	2	4	6	12
Tostado 130°C	6	12	6	12	2	4	14	28
Tostado 150°C	2	4	2	4	2	4	6	12
Total	14	28	14	28	10	20	38	76

Ext., extracciones. An., determinaciones analíticas (por cada método de análisis)

2.2. Solventes y reactivos

Hexano, Carbonato, Metanol extra puro, 1-butanol, ácido gálico monohidratado reactivo Folín-Ciocalteu, adquiridos de (Panreac, España), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox), adquiridos de (Aldrich Chemical, Alemania), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), adquiridos de (Sigma, Chemical, Alemania).

2.3. Tostado del cacao

El proceso de tostado iniciaba con el calentamiento previo del horno durante media hora, y se realizaba siempre a 100 gramos de cada muestra de semilla con cáscara. Las semillas se distribuían uniformemente en una parrilla de acero inoxidable, que se introducía dentro de una estufa modelo Digitronic (SELECTA, Barcelona España), como muestra la Figura. 2.1. Al retirarlas de la estufa se enfriaban a temperatura ambiente por una hora, antes de iniciar el proceso de desgrasado.



Figura. 2.1. Estufa modelo Digitronic (SELECTA, Barcelona, España)

2.4. Obtención de los extractos polifenólicos

El acondicionamiento de la muestra para la cuantificación de polifenoles, actividad antioxidante y color, es ilustrado mediante la Figura 2.2, siguiendo las pautas de los autores Jonfia-Essien et al. (2008), y Summa et al. (2006), con algunas modificaciones en la etapa de desgrasado.

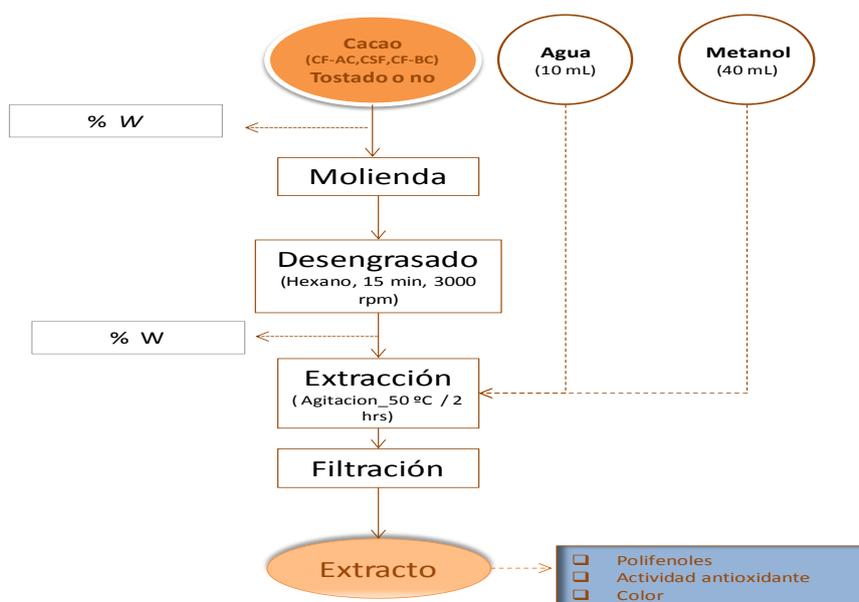


Figura 2.2. Adaptación de Esquema empleado en el acondicionamiento de la muestra y extracción, elaboración propia, con datos de, Jonfia-Essien, W.A, &, Summa, C .

2.4.1. Desgrasado del cacao

El procesado de las semillas de cacao, ya fueran tostadas o no, se inicia con el descascarillado manual de las semillas, este proceso fue más complicado en la semilla no fermentada por lo difícil que es desprender la cáscara. A continuación las semillas descascarilladas se molían en un triturador eléctrico (Coffee blender). Este proceso se realizaba sometiendo a la semilla al triturador por 30 segundos, hasta lograr el polvo de cacao, por periodos mayor a 30 segundos el polvo de cacao se vuelve viscoso, similar al licor de cacao.

Se pesaban 5 gramos del polvo de cacao en los tubos de la centrifugadora, tarando primero el tubo en balanza de precisión, posteriormente se le agregaba 25mL de hexano, inmediatamente se agitaba por 3 minutos cada tubo conteniendo al muestra, y se procedía a la centrifugación durante 15 minutos a 4 °C, a 3.000 rpm, repitiendo todo el proceso 4 veces, utilizando para tal fin centrifuga modelo Medifriger BL-S (SELECTA-Barcelona, España), similar a la mostrada en la Figura. 2.3. Las muestras una vez desgrasadas se dejaban por una noche completa en la campana, con ventilación. Al día posterior se determinaba la humedad.



Figura 2.3. Centrifuga modelo Medifriger. BL-S (SELECTA-Barcelona, España)

2.4.2. Extracción de los compuestos fenólicos

De la muestra desgrasada, ya fuera de semilla sin tueste o con tueste, se colocaban 2 gramos de cacao en polvo en matraz de Erlenmeyer 100 mL, agregándosele 50 mL de una solución de metanol al 80% y 20%, e inmediatamente se agitaban por dos horas en un agitador modelo Orbital mini Sheker (Figura. 2.4) a 50 °C por 2 horas. Posteriormente se filtraba y dejaba enfriar durante 1 hora y luego enrasaba en matraz de

50 mL, aforando con la misma solución inicial, reponiendo las pérdidas por la temperatura durante la agitación.



Figura. 2.4. Orbital mini Shaker (VWR. EE.UU)

2.5. Determinación de la humedad.

De la muestra a desgrasar se tomaban 100 gramos de la semilla con cascara y se introducían en la estufa utilizada para el tostado, el cual se calentaba previamente durante media hora, siempre a temperatura de 100 °C, hasta obtener tres medidas similares.

En muestras desgrasadas, se retiraban 2 gramos de los 5 desgrasados y se introducían en la estufa previamente calentada a 100 °C, hasta obtener tres medidas similares. La humedad se expresa en porcentaje (w%) según la ecuación: % humedad= (peso perdido/peso inicial)*100

2.6. Determinación de la composición fenólica global, actividad antioxidante y color

La cuantificación de polifenoles y actividad antioxidante se puede realizar a los extractos de la semilla de cacao como materia prima³⁰ y a los derivados de la semilla de cacao como el chocolate⁷². De esta forma se puede estimar el impacto en la concentración natural de los polifenoles y actividad antioxidante por el proceso de fermentado⁷³, o bien el efecto combinado de fermentado y tostado de la semilla de cacao⁷⁴. Para cuantificar polifenoles totales en los extractos de la semilla, principal objetivo de este trabajo, se empleo el clásico método de FOLIN y, DPPH, y para determinar la actividad antioxidante respectivamente⁷⁵

2.6.1. Método de Folin-Ciocalteu

Para la obtención del índice de Folin se procedió de la siguiente manera; en un matraz aforado de 100 mL se introducían primero 50 mL de agua tipo II grado analítico sucesivamente y dependiendo del extracto de semilla de cacao a analizar, se agregaban;

1.) 0,5 mL del extracto de semilla de cacao tipo “CF-AC”,

2.) 0,2 mL del extracto de semilla de cacao tipo “CSF”

3.) 0,40 mL del extracto de semilla de cacao tipo “CF-BC”,

y a continuación 5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, 20 mL de solución carbonato de sodio al 20% (preparado un día antes de realizar el análisis), y finalmente se enrasaba con agua destilada hasta alcanzar los 100 mL. Inmediatamente se agitaba por 7 veces, y iniciaba el cronometro para realizar el análisis después de 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 750 nm en una cubeta desechable de 1 cm de espesor, en un espectrofotómetro Cintra 20 (GMBH, Alemania) de doble haz (CCE, 1991). El resultado se expresó en equivalentes de ácido gálico, a través de la realización de una curva patrón de este componente con concentraciones de 0 a 600 mg/l.

2.6.2. Determinación de la actividad antioxidante (AA)

Basados en la técnica de Rivero-Perez et al. 2007 ⁷⁶, pero con algunas modificaciones se mezclaron el extracto diluido 10 veces en los casos de los extractos de semilla A y C y 30 veces los extractos de la semilla B (0,060 ml) y 2,940 ml de solución metanólica de 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH) con una concentración de 60 μ M (0,0023 g/100 ml de CH₃OH) en una cubeta desechable de poliestireno de 1 cm y se midió la absorbancia a 515 nm al momento de realizar la mezcla (tiempo cero), y a una hora, contra metanol en un espectrofotómetro Cintra 20 (GMBH, Alemania) de doble haz de luz. La actividad antioxidante (AA) se reportó como micromoles de trolox por gramo de extracto seco, a través de una curva de calibración con concentraciones de trolox de 0,08 mM hasta 1 mM, tomando como variable dependiente la diferencia de absorbancia a 515 nm después de una hora.

2.6.3. Determinación de la intensidad del color y la tonalidad de los extractos

Se determinó la intensidad del color “amarillo” y “rojo” de los extractos a partir de las absorbancias a 460 y 525 nm, respectivamente. Para ello fue necesario diluir los extractos. En el caso de las muestras de **CSF** se empleó un factor de dilución de **50** (5 /0.1 mL) este análisis iniciaba colocando 5 mL de agua calidad analítica en tubos de ensayo de 10 mL y inmediatamente se agregaban 0.1 mL del extracto, el cual se agitaba durante 30 segundos.

En los extractos **CF-AC** y **CF-BC**, el factor de dilución fue de **20** (4/0.2 mL) y se procedió de la misma manera, colocando 4 mL de agua calidad analítica en tubos de ensayo de 10 mL y posteriormente se le agregaban 0.2 mL del extracto correspondiente, y se agitaba durante 30 segundos.

Una vez preparadas las muestras se procedía a realizar el análisis en espectrofotómetro Cintra 20 (GMBH, Alemania) de doble haz de luz, el cual se calibraba previamente con agua calidad analítica tipo II, a 460 y 525 nm, para realizar este análisis se empleaban cubetas desechables plásticas de 10 x 10 x 45 mm.

Una vez obtenidas las lecturas espectrofotométricas se determinó la absorbancia a 460 nm (**A460**) y a 525 nm (**A525**) multiplicando por los factores de dilución correspondientes. A partir de estos valores se determinó la **Tonalidad** de los extractos (A460/A525).

2.7. Tratamiento Estadístico de los datos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa “Statgraphics”, realizando análisis comparativo de varianzas ANOVA, para determinar la existencia o no de diferencias significativas en los diferentes parámetros analíticos, a un nivel de significancia de $p < 0,05$, con el objetivo de:

- Comparación de los tres tipos de cacao (CSF,CF-AC, CF-BC) previamente a su tostado.
- Comprobar el efecto de los diferentes tratamientos de tostado sobre las características de cada una de las muestras de cacao.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Caracterización inicial de las muestras (CSF/ CF-BC / CF-AC)

La caracterización inicial de las muestras se resume en la tabla 3.1. donde se indican los valores medios y desviaciones típicas de los distintos parámetros analíticos: polifenoles totales (PT), actividad antioxidante (AA), absorbancia a 460 nm (A460), absorbancia a 520 nm (A520), y el cociente de ambas la tonalidad. En todas las variables se observan diferencias significativas, sobre todo entre el cacao no fermentado (CSF) y las dos muestras de cacao fermentado.

Tabla.3.1. Caracterización inicial de las muestras de cacao. (medias \pm desviaciones típicas *)

Muestras	PT (mg/L)	AA (μ M/L)	A460 (UA)	A520 (UA)	Tonalidad
CSF	115 \pm 2c	709 \pm 17c	6,5 \pm 0,2c	6,1 \pm 0,3c	1,06 \pm 0,03a
CF-BC	56 \pm 2b	154 \pm 8b	3,0 \pm 0,2a	2,4 \pm 0,1a	1,27 \pm 0,09b
CF-AC	43 \pm 1a	124 \pm 4a	3,4 \pm 0,1b	2,7 \pm 0,1b	1,28 \pm 0,04b

(*) Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los valores medios, con un 95% de confianza.

Los resultados comprueban, que las semillas de CSF se caracterizan por poseer similares concentraciones de polifenoles a las observadas en la bibliografía. Se ha comprobado que la riqueza polifenólica es independientemente del origen y variedad ⁷⁷. Además, el CSF posee superiores concentraciones de PT y AA, en comparación con semillas fermentadas. Todo lo anterior concuerda con lo observado por otros autores: la fermentación provoca disminución significativa en la riqueza polifenólica influyendo en la calidad organoléptica de sus derivados ⁵²

A modo de ejemplo, realizamos la comparación del CSF proveniente de “Waslala” en **Nicaragua**, de la variedad *trinitario*, que posee una concentración de PT (115 \pm 2 mg.g⁻¹), muy similar a la variedad sin fermentar *forastero* (108,76 mg.g⁻¹) del municipio de “Teixeira de Freitas”, **Brasil**. Observándose lo mismo en las semillas fermentadas de buena calidad, para las cuales los mismos autores obtuvieron un valor medio de 43,1 mg.g⁻¹, idéntico al obtenido en la muestra CF-AC de Nicaragua. ⁷⁸.

En lo que respecta a las variables de color en la semilla de CSF, esta presenta una intensidad de color (A460, A520) más de dos veces superior que los cacaos no fermentados. La semilla CSF se caracteriza por el color violeta intenso, color relacionado con concentraciones de polifenoles específicos como las catequinas y antocianinas ³¹. En cambio el color de las semillas fermentadas es menos rojizo y más marrón que el de las semillas sin fermentar, debido a que al ser fermentada las diversas reacciones bioquímicas oxidan los compuestos que le caracterizan en su estado natural oscureciendo los cotiledones, que pasan a presentar la coloración marrón. ^{46, 79}.

3.2. Efectos del tostado en las muestras de cacao

El fermentado puede considerarse una precondition del tostado del cacao para la obtención de chocolate. En Nicaragua las semillas de cacao sin fermentar y de cacao fermentado de baja calidad son destinadas para el consumo local, y su tueste se realiza en comales calentados con leña durante el proceso de elaboración de refrescos típicos (como el pinol, pinolillo y cacao con leche) de gran consumo local. En las tablas 3.2, 3.3 y 3.4 se contrastan los resultados obtenidos antes y después de los tratamientos térmicos en las diferentes muestras. En las tablas 3.5 y 3.6 se muestra la evolución de los parámetros analíticos a lo largo del tostado a 130°C de las muestras CSF y CF-AC, respectivamente.

Tabla.3.2. Efecto de tres diferentes temperaturas de tostado en muestra de cacao sin fermentar - CSF (medias \pm desviaciones típicas *)

Muestra	PT	AA	A460	A520	Tonalidad
CSF	(mg/L)	(μ M/L)	(UA)	(UA)	
Inicial (CSF)	115 \pm 2c	709 \pm 17a	6,5 \pm 0,2a	6,1 \pm 0,3a	1,06 \pm 0,03a
110°C/90 min	99 \pm 2a	723 \pm 21a	6,7 \pm 0,2a	6,0 \pm 0,2a	1,12 \pm 0,00a
130°C/60 min	69 \pm 3b	711 \pm 15a	12,5 \pm 0,9c	10,6 \pm 0,6b	1,17 \pm 0,01a
150°C/45 min	119 \pm 1d	1.687 \pm 54b	8,3 \pm 0,3b	6,5 \pm 0,2a	1,28 \pm 0,01b

(*) Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los valores medios, con un 95% de confianza.

Atendiendo a la variable (PT) se observa que el tostado provoca un descenso de su concentración en todas las muestras y en todos los tratamientos, con la excepción del tostado a 150°C de la muestra CSF, en el que se observa un valor de PT ligeramente

superior al inicial. En los cacaos fermentados el tratamiento a menor temperatura parece afectar en menor medida al descenso del contenido en polifenoles totales. Las tablas 3.5 y 3.6 muestran que el descenso de PT durante el tostado a 130°C en las muestras CSF y CF-AC se produjo de forma gradual a lo largo del tiempo.

La disminución en PT observada concuerda con lo descrito por otros autores ⁸⁰, ⁸¹, ⁶⁴. Durante el tostado se producen reacciones de oxidación de compuestos fenólicos, que conducen a procesos de polimerización y de formación de compuestos insolubles de alto peso molecular. Además los polifenoles reaccionan con proteínas, lo que contribuye también a su descenso.⁸²

Tabla.3.3. Efecto de las diferentes temperaturas de tostado en muestra de cacao fermentado de baja calidad= CF-BC (medias \pm desviaciones típicas *)

Muestra	PT (mg/L)	AA (μ M/L)	A460 (UA)	A520 (UA)	Tonalidad
Inicial	56 \pm 2c	154 \pm 8a	3,0 \pm 0,2a	2,4 \pm 0,1b	1,27 \pm 0,09a
110°C/90 min	45 \pm 0b	250 \pm 12b	3,1 \pm 0,0a	2,4 \pm 0,1b	1,31 \pm 0,04b
130°C/60 min	41 \pm 2a	165 \pm 14a	3,0 \pm 0,2a	2,1 \pm 0,1a	1,45 \pm 0,01b
150°C/45 min	39 \pm 1a	382 \pm 21c	4,9 \pm 0,1b	3,3 \pm 0,1c	1,49 \pm 0,00c

(*) Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los valores medios, con un 95% de confianza.

Tabla.3.4. Efecto de las diferentes temperaturas de tostado en muestra de cacao fermentado de alta calidad= CF-AC (medias \pm desviaciones típicas *)

Muestra	PT (mg/L)	AA (μ M/L)	A460 (UA)	A520 (UA)	Tonalidad
Inicial	43 \pm 1d	124 \pm 4a	3,4 \pm 0,1b	2,7 \pm 0,1b	1,28 \pm 0,04a
110°C/90 min	38 \pm 1c	253 \pm 6b	3,8 \pm 0,0c	2,7 \pm 0,0b	1,38 \pm 0,00b
130°C/60 min	29 \pm 1a	248 \pm 9b	3,2 \pm 0,0a	2,3 \pm 0,0a	1,37 \pm 0,00c
150°C/45 min	32 \pm 1b	464 \pm 23c	3,9 \pm 0,1d	2,7 \pm 0,0b	1,45 \pm 0,01c

(*) Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los valores medios, con un 95% de confianza.

En cambio, el comportamiento de AA es distinto al de PT. Con el tostado, en general se observa o bien un mantenimiento de la actividad antioxidante o bien un incremento, particularmente acusado con el tostado a 150°C. Durante el tostado a

130°C, en la muestra CSF (tabla 3.5) se observa un ligero ascenso tras 20 minutos, para volver de nuevo a los valores iniciales a los 40 y 60 minutos. En la muestra CF-AC (tabla 3.6), la AA aumenta muy significativamente tras los 20 minutos para mantenerse constante a continuación con alguna oscilación.

Los resultados parecen indicar que determinados productos generados durante el tostado, fruto probablemente de la degradación de los polifenoles, y de reacciones de Maillard, tienen un poder antioxidante superior al de los compuestos de partida. No obstante, esto no parece concordar con lo descrito en la bibliografía donde se han observado descensos de la actividad antioxidante durante el tostado de cacao tanto a temperaturas moderadas de 100-130°C⁸³ como a temperaturas muy elevadas de 180°C⁸¹.

Tabla.3.5. Evolución del contenido en polifenoles, la actividad antioxidante y el color en muestra CSF durante su tostado a 130°C. (medias \pm desviaciones típicas *)

Muestra	PT	AA	A460	A520	Tonalidad
CSF	(mg/L)	(μ M/L)	(UA)	(UA)	
Inicial	115 \pm 2a	709 \pm 17a	6,5 \pm 0,2a	6,1 \pm 0,3a	1,06 \pm 0,03a
130°C/20min	84 \pm 4b	831 \pm 143b	9,2 \pm 1,3b	7,9 \pm 0,3b	1,16 \pm 0,13b
130°C/40min	82 \pm 3b	720 \pm 31a	9,9 \pm 0,6b	8,5 \pm 0,4c	1,15 \pm 0,04b
130°C/60min	69 \pm 3c	711 \pm 15a	12,5 \pm 0,9c	10,6 \pm 0,6d	1,17 \pm 0,01b

(*) Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los valores medios, con un 95% de confianza

Tabla.3.6. Evolución del contenido en polifenoles, la actividad antioxidante y el color en muestra CF-AC durante su tostado a 130°C (medias \pm desviaciones típicas *)

Muestra	PT	AA	A460	A520	Tonalidad
CF-AC	(mg/L)	(μ M/L)	(UA)	(UA)	
Inicial	43 \pm 1d	124 \pm 4a	3,4 \pm 0,1b	2,7 \pm 0,1c	1,28 \pm 0,04a
130°C/20min	42 \pm 1c	249 \pm 9c	3,0 \pm 0,1a	2,1 \pm 0,0a	1,40 \pm 0,07b
130°C/40min	36 \pm 2b	203 \pm 7b	3,0 \pm 0,1a	2,2 \pm 0,0ab	1,34 \pm 0,02b
130°C/60min	29 \pm 1a	248 \pm 9c	3,2 \pm 0,0ab	2,3 \pm 0,0b	1,37 \pm 0,00b

(*) Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas entre los valores medios, con un 95% de confianza

En lo que se refiere al color las variables que reflejan su intensidad (A460 y A520) no parecen mostrar unas tendencias claras en función del tipo de cacao y/o de la temperatura de tostado como muestra las figuras 3.1, 3.2 y 3.3. En algunos casos aumentan (CSF, tostado a 130 °C; CF-BC, tostado a 150 °C) con respecto a los valores iniciales y en otros casos disminuyen (CF-AC, tostado a 130 °C). En la figura 3.4 se aprecia cómo en la muestra CSF la concentración de color aumenta progresivamente a lo largo del tostado 130 °C. Sin embargo, en el cacao fermentado CF-AC, dicha concentración de color disminuye, principalmente tras los primeros 20 minutos (tabla 3.6).

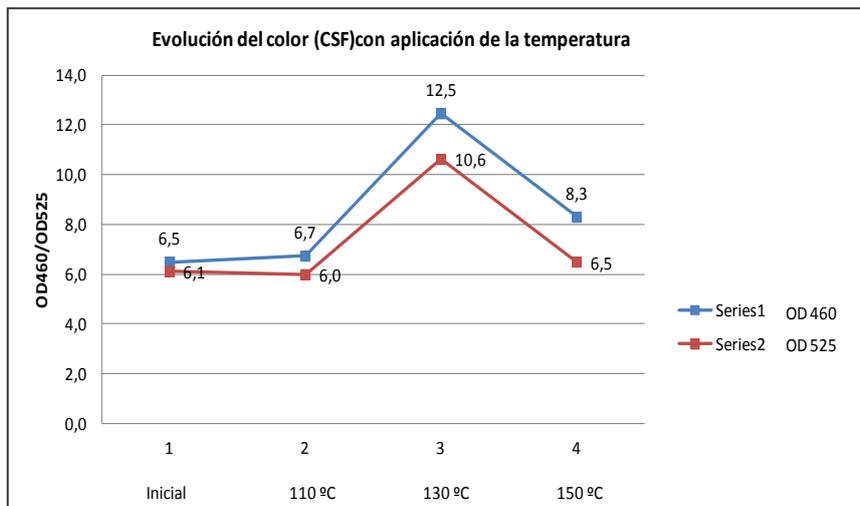


Figura.3.1 Tendencias del color del CSF, en función de la temperatura de tostado

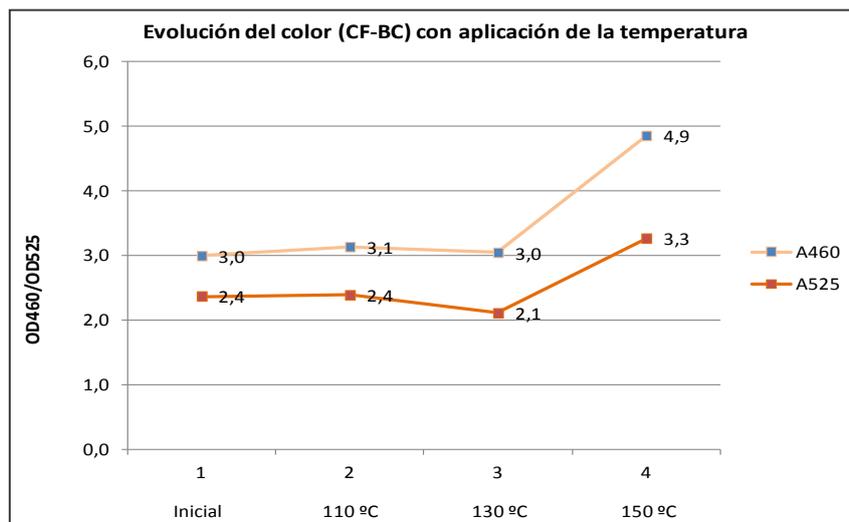


Figura.3.2 Tendencias del color del CF-BC, en función de la temperatura de tostado

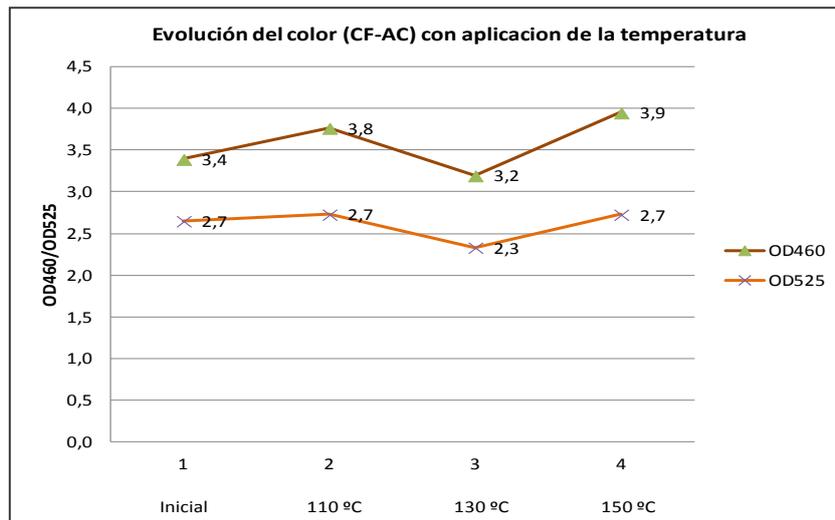


Figura.3.3 tendencias del color del CF-AC, en función de la temperatura de tostado

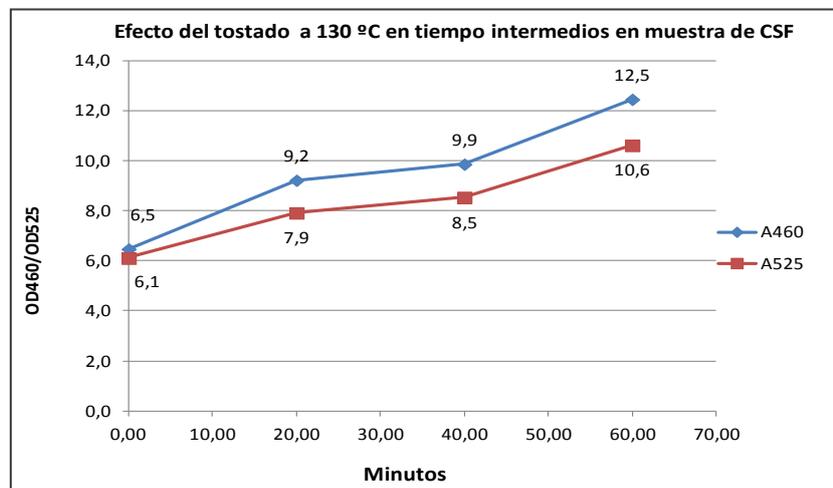


Figura 3.4. Tendencias del color del CSF, en función de la temperatura 130 °C y tiempo intermedios de tostado.

Dónde sí se observa una tendencia más o menos constante es en la variable tonalidad (A460/A520), tal y como se puede apreciar en la Figura. 3.4. Ya sea el CSF, o cualquiera de los cacaos fermentados, el tostado provoca un pardeamiento del color de las semillas, debido a múltiples reacciones que tiene que ver con la oxidación de polifenoles, la degradación de proteínas, y las reacciones de Maillard.⁸⁴ El proceso de pardeamiento fue tanto más intenso cuanto más alta es la temperatura del tostado, lo que concuerda en gran medida con los resultados obtenidos por otros autores⁶⁹ empleando tratamientos de tostado muy similares a los realizados en el presente trabajo (110, 135 y 150°C). Así mismo se observa en las tablas 3.5 y 3.6 que el aumento de la tonalidad

parece producirse en las fases iniciales del tostado, tanto en el cacao sin fermentar como en el fermentado CF-AC.

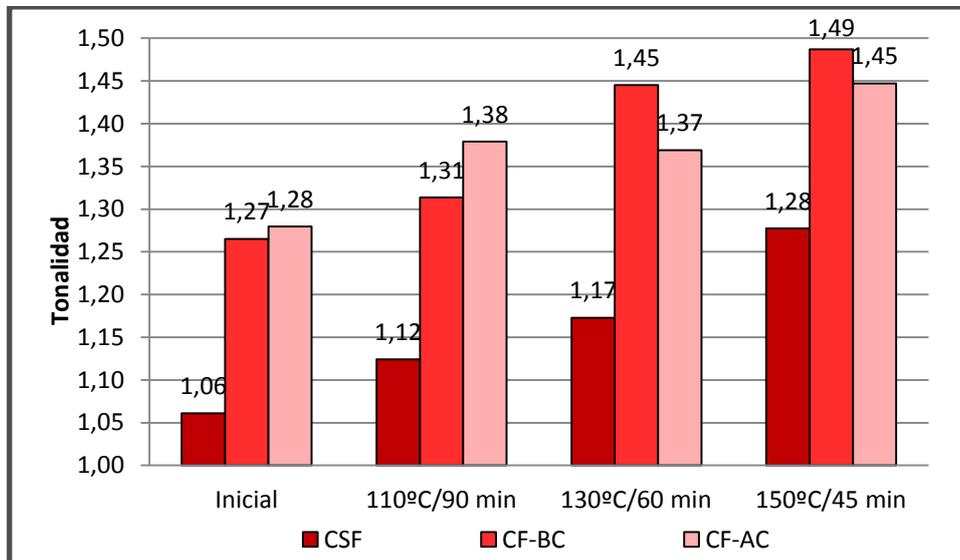


Figura 3.5. Tonalidad de las muestras de cacao antes y tras los tratamientos de tostado

Capítulo 4

Conclusiones

1. El contenido en PT de las muestras de cacao nicaragüenses variedad *Trinitario* fue similar al descrito en muestras de cacao de la misma o distinta variedad de otros orígenes geográficos.
2. Los valores en la concentración de polifenoles totales (PT) y actividad antioxidante (AA) fueron mucho más elevados en el cacao sin fermentar (CSF) que en las muestras de cacao fermentado.
3. Así mismo los parámetros relativos al color reflejan cómo tras la fermentación los extractos de cacao presentan un color de menor intensidad y con una tonalidad menos rojiza.
4. El tostado del cacao provocó un descenso del contenido en PT, en particular en los cacaos fermentados, y más acusado a temperaturas de tostado de 130°C y 150°C que a 110°C.
5. Por el contrario, el tostado provocó un incremento de los valores de actividad antioxidante de todas las muestras de cacao, sobretodo en el caso de los tratamientos a 150°C.
6. El tostado afectó al color de los extractos de cacao provocando un pardeamiento del mismo, tanto más intenso cuanto más alta era la temperatura de tostado.

Referencias

1. Weisburger, J. H., *Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases*. 2001; Vol. 226, p 891-897.
2. Trognitz, B.; Scheldeman, X.; Hansel-Hohl, K.; Kuant, A.; Grebe, H.; Hermann, M., Genetic Population Structure of Cacao Plantings within a Young Production Area in Nicaragua. *Plos One* **2011**, *6* (1).
3. López, M., Manual técnico para implementar el manejo integral del cultivo de cacao (MICA0). *INTA. Managua. Nicaragua* **2004**, *1*, 12p.
4. Kozikowski, A. P.; Tuckmantel, W.; Bottcher, G.; Romanczyk, L. J., Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4. Synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all-4 beta,8-interflavan connectivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest. *J Org Chem* **2003**, *68* (5), 1641-1658.
5. Ruzaidi, A. M. M.; Abbe, M. M. J.; Amin, I.; Nawalyahl, A. G.; Muhajirl, H., Protective effect of polyphenol-rich extract prepared from Malaysian cocoa (*Theobroma cacao*) on glucose levels and lipid profiles in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sci Food Agr* **2008**, *88* (8), 1442-1447.
6. Watson, N., Processing the cocoa. *Kennedy's Confection* **2005**, (Oct.).
7. (a) Bravo, L.; Lecumberri, E.; Mateos, R.; Ramos, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Goya, L., A diet rich in dietary fibre from cocoa improves lipid profile. *Agro Food Ind Hi Tec* **2008**, *19* (5), 10-12; (b) Schinella, G.; Mosca, S.; Cienfuegos-Jovellanos, E.; Angeles Pasamar, M.; Mugerza, B.; Ramon, D.; Luis Rios, J., Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Res Int* **2010**, *43* (6), 1614-1623.
8. Torres-Moreno, M.; Tarrega, A.; Costell, E.; Blanch, C., Dark chocolate acceptability: influence of cocoa origin and processing conditions. *J Sci Food Agr* **2012**, *92* (2), 404-411.
9. Lecour, S.; Lamont, K. T., Natural Polyphenols and Cardioprotection. *Natural Polyphenols and Cardioprotection. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2011**, *11* (14), 1191-1199.
10. Devesa, J. A., Plantas con semillas. *McGraw-Hill Interamericana, Madrid* **2004**, *II*, 417-636.
11. Elwers, S.; Zambrano, A.; Rohsius, C.; Lieberei, R., Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229* (6), 937-948.
12. Buamah, R.; Dzogbefia, V. P.; Oldham, J. H., Pure yeast culture fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L): effect on yield of sweatings and cocoa bean quality. *Pure yeast culture fermentation of cocoa (Theobroma cacao L): effect on yield of sweatings and cocoa bean quality. World Journal of Microbiology & Biotechnology* **1997**, *13* (4), 457-462.
13. Wells, M., Chocolate production: from bean to bar. *New Food* **2004**, *7* (3), 8, 10-14.
14. Iida, F.; Chida, M.; Kasai, M.; Sakanoshita, N.; Sakurai, K.; Kamiwaki, T., Effect of fat type and content on palatability of chocolate. *J Jpn Soc Food Sci* **2007**, *54* (1), 18-25.
15. (a) Rusconi, M.; Conti, A., *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res* **2010**, *61* (1), 5-13; (b) Mejia, G. B.; Guzman, D. C.; Olguin, H. J.; Martinez, N. H.; Cruz, E. G.; Ramirez, A. M.; Ruiz, N. L.; Jimenez, G. E.; Brizuela, N. O.; Alvarez, R. G.; Mendoza, E. O., The administration of food supplemented with cocoa powder during nutritional recovery reduces damage caused by oxidative stress in rat brain. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **2011**, *384* (6), 499-504.
16. Scholey, A. B.; French, S. J.; Morris, P. J.; Kennedy, D. O.; Milne, A. L.; Haskell, C. F., Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort. *J Psychopharmacol* **2010**, *24* (10), 1505-1514.
17. Stoclet, J. C.; Schini-Kerth, V., Dietary flavonoids and human health. *Ann Pharm Fr* **2011**, *69* (2), 78-90.
18. Beckett, S. T., Industrial chocolate manufacture and use. *London: Chapman and Hall* **1994**, *2*, 408.

19. Trognitz, B.; Scheldeman, X.; Hansel-Hohl, K.; Kuant, A.; Grebe, H.; Hermann, M., Genetic Population Structure of Cacao Plantings within a Young Production Area in Nicaragua. *Plos One* **2011**, *6* (1).
20. Kasai, M.; Ishikawa, Y.; Sakamaki, A.; Okuyama, S.; Ashitani, H.; Kamiwaki, T.; Lida, F., Effect of cocoa bean origins on the palatability of chocolate. *J Jpn Soc Food Sci* **2007**, *54* (7), 332-338.
21. Adomako, B.; Adu-Ampomah, Y., Bean characteristics of progenies of upper Amazon cacao in Ghana. *Trop Agr* **2003**, *80* (1), 41-47.
22. Motamayor, J., Etude de la diversité génétique et de la domestication des cacaoyers du groupe Criollo (*Theobroma cacao* L.) à l'aide de marqueurs moléculaires. *Paris, Université Paris XI, PhD thesis* **2001**.
23. Jonfia-Essien, W. A.; West, G.; Alderson, P. G.; Tucker, G., Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chem* **2008**, *108* (3), 1155-1159.
24. Bispo, E. S.; Ferreira, V. L. P.; Menezes, H. C.; Vitali, A. A.; Yotsuyanagi, K., Alkalinization process for cocoa (*Theobroma cacao* L.) nibs and quality evaluation of the powder by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology* **2002**, *39* (1), 14-20.
25. (a) Kealey, K. S.; Snyder, R. M.; Romanczyk, L. J., Jr.; Hammerstone, J. F., Jr.; Buck, M. M.; Cipolla, G. G. Use of non-alkalized cocoa solids in a drink. US 6 673 379 B2, 2004; (b) Kealey, K. S.; Snyder, R. M.; Romanczyk, L. J., Jr.; Hammerstone, J. F., Jr.; Buck, M. M.; Cipolla, G. G. Method for producing fat and/or solids from beans and compositions containing polyphenols. US 2005/0276893 A1, 2005.
26. Kealey, K. S.; Snyder, R. M.; Romanczyk, L.; Geyer, H.; Meyers, M. E.; Whitacre, E. J.; Hammerstone, J. F. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses. EP 1 680 963 A1, 2006, 2006.
27. Kealey, K. S.; Snyder, R. M.; Romanczyk, L. J., Jr.; Hammerstone, J. F., Jr.; Buck, M. M.; Cipolla, G. G. Method for solvent extracting cocoa butter from cocoa nibs. US 2007/0264417 A1, 2007.
28. Beckett, S. T., *The Science of Chocolate*, RSC Pub **2008**, 2.
29. Abbasi, S.; Farzanmehr, H., Optimization of the Formulation of Prebiotic Milk Chocolate Based on Rheological Properties. *Food Technol Biotech* **2009**, *47* (4), 396-403.
30. Padilla, F. C.; Rincon, A. M.; Bou-Rached, L., Polyphenol content and antioxidant activity of several seeds and nuts. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2008**, *58* (3), 303-308.
31. Cakirer, M.; Ziegler, G. R.; Guiltinan, M. J.; Jones, A. D., *Fresh bean colour as an indicator of chocolate flavour potential*. 2003; p 540-543.
32. Rusconi, M.; Conti, A., *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol Res* **2010**, *61* (1), 5-13.
33. de Brito, E. S.; Garcia, N. H. P.; Gallao, M. I.; Cortelazzo, A. L.; Fevereiro, P. S.; Braga, M. R., Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting. *J Sci Food Agr* **2001**, *81* (2), 281-288.
34. Schramm, D. D.; Wang, J. F.; Holt, R. R.; Ensunsa, J. L.; Gonsalves, J. L.; Lazarus, S. A.; Schmitz, H. H.; German, J. B.; Keen, C. L., Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* **2001**, *73* (1), 36-40.
35. Tuckmantel, W.; Kozikowski, A. P.; Romanczyk, L. J., Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 1. Preparation of building blocks from (+)-catechin. Procyanidin formation. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor, 3-O-galloyl-(2R,3R)-epicatechin-4 beta,8-[3-O-galloyl-(2R,3R)-epicatechin]. *J Am Chem Soc* **1999**, *121* (51), 12073-12081.
36. Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P., *Food chemistry*. 2004.
37. Brito, E. S., Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor. *Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas* **2000**, 134.
38. Visioli, F.; Davalos, A., Polyphenols and Cardiovascular Disease: A Critical Summary of the Evidence. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2011**, *11* (14), 1186-1190.

39. Cheynier, V., Moutounet, M. y Sarni-Machado, P. , Los compuestos fenólicos. *Editado por C. Flanzy. Madrid: Madrid Vicente ediciones y Ediciones Mundi-Prensa. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* **2000**, 114-116 p
40. Pérez, G., Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomedica* **2003**, 22, n°1, , 48-57.
41. Deshpande, S. S., Cheryan, M. y Salunkhe, D. K. , Tannin analysis of food products. . *Crit Rev Food Sci* **1986**, 24, n°4, 401-449.
42. Hagerman, A. E., Tannin Handbook *Disponible en internet. www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf*. **1998-2002**.
43. Lin, B., Polyphenols and Neuroprotection against Ischemia and Neurodegeneration. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2011**, 11 (14), 1222-1238.
44. Vriens, H., Healthy chocolate. *Baking & Snack International* **2010**, (July--Sept.), 26-27.
45. Forsyth, W. G. C. Q., V. C. , Cocoa glycosidase and color changes during fermentation. *J Sci Food Agr* **1957**, 8-9, 505-509
46. Lopez, A. S., Chemical changes occurring during the processing of cacao. *Cocoa biotechnology symposium. Pennsylvania State Univ., Pa* **1986**, , 19-53.
47. Hii, C. L.; Law, C. L.; Suzannah, S.; Misnawi; Cloke, M., Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **2009**, 2 (4), 702-722.
48. Ardhana, M. M.; Fleet, G. H., The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol* **2003**, 86 (1-2), 87-99.
49. Sato, K.; Sakiyama, K., Chocolate cocoa is a fermented food. *Kagaku to Seibutsu* **2011**, 49 (8), 523-526.
50. Tagro Guehi, S.; Dabonne, S.; Ban-Koffi, L.; Kra Kedjebo, D.; Zahouli, G. I. B., Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science & Technology* **2010**, 2 (3), 163-171.
51. Wollgast, J.; Anklam, E., Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int* **2000**, 33 (6), 423-447.
52. Bonvehi, J. S.; Coll, F. V., Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chem* **1997**, 60 (3), 365-370.
53. Zahouli, G. I. B.; Tagro Guehi, S.; Monke Fae, A.; Ban-Koffi, L.; Gnopo Nemlin, J., Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. *Advance Journal of Food Science & Technology* **2010**, 2 (4), 184-190.
54. Efraim, P.; Pezoa-Garcia, N. H.; Calil Pereira Jardim, D.; Nishikawa, A.; Haddad, R.; Nogueira Eberlin, M., Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. *Ciencia Tecnol. Aliment.* **2010**, 30 (Suppl. 1), 142-150.
55. Efraim, P., Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate. *Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas.* **2004**, 114
56. Lerceteau, E.; Rogers, J.; Petiard, V.; Crouzillat, D., Evolution of cacao bean proteins during fermentation: a study by two-dimensional electrophoresis. *J Sci Food Agr* **1999**, 79 (4), 619-625.
57. Rosa, O. O.; Guerra, L. D. d. S.; Sanches, R.; Terra, C. B. C.; Faria, C. P.; Lima, M. G. d.; Rossignoli, P. A.; da S. Guerra, L. D.; de Lima, M. G., Microbiological evaluation of homemade chocolate candies. *Higiene Alimentar* **2010**, 24 (190/191), 50-53.
58. Adriaenssens, M., Impact of ingredients on chocolate flavor. *Manuf Confect* **2010**, 90 (9), 87-94.
59. Ramli, N.; Hassan, O.; Said, M.; Samsudin, W.; Idris, N. A., Influence of roasting conditions on volatile flavor of roasted Malaysian cocoa beans. *Journal of Food Processing and Preservation* **2006**, 30 (3), 280-298.
60. Anon, Cocoa bean processing. *Asia & Middle East Food Trade* **1995**, 12 (4), 36.
61. Nebesny, E.; Rutkowski, J., Effect of roasting and secondary fermentation on cocoa bean enrichment. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **1998**, 7 (3), 437-445.

62. Anon, Energy-saving and environmentally friendly cocoa roasting. *Kennedy's Confection* **2009**, (July), 20-21.
63. Afoakwa, E. O.; Paterson, A.; Fowler, M.; Ryan, A., Flavor formation and character in cocoa and chocolate. *Crit Rev Food Sci* **2008**, *48* (9), 840-857.
64. Jolic, S. M.; Redovnikovic, I. R.; Markovic, K.; Sipusic, D. I.; Delonga, K., Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *Int J Food Sci Tech* **2011**, *46* (9), 1793-1800.
65. Nebesny, E.; Rutkowski, J., Effect of cocoa bean enrichment and chocolate mass conching on the composition and properties of chocolates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **1998**, *7* (4), 673-681.
66. Hurst, W. J.; Payne, M. J.; Miller, K. B.; Stuart, D. A., Stability of cocoa antioxidants and flavan-3-ols over time. *J Agr Food Chem* **2009**, *57* (20), 9547-9550.
67. Lee, S.-Y., Yoo, S.-S., Lee, M.-J., Kwon, I.-B., & Pyun, Y.-R. , Optimalization of Nibs roasting in cocoa bean processing with Lotte-Better taste and color process. *Food Science Biotechnology* **2001**, 286-293.
68. Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & van Boeckel, M. A. J. S. , A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology* **2001**, 364-373.
69. Krysiak, W., Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *J. Food Eng.* **2006**, *77* (3), 449-453.
70. Rodriguez-Campos, J.; Escalona-Buendia, H. B.; Contreras-Ramos, S. M.; Orozco-Avila, I.; Jaramillo-Flores, E.; Lugo-Cervantes, E., Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chem* **2012**, *132* (1), 277-288.
71. Huang, Y.; Barringer, S. A., Monitoring of Cocoa Volatiles Produced during Roasting by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). *J Food Sci* **2011**, *76* (2), C279-C286.
72. Langer, S.; Marshall, L. J.; Day, A. J.; Morgan, M. R. A., Flavanols and Methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A Study of the Correlation with Nonfat Cocoa Solids. *J Agr Food Chem* **2011**, *59* (15), 8435-8441.
73. Lima, L. J. R.; Almeida, M. H.; Nout, M. J. R.; Zwietering, M. H., Theobroma cacao L., "The Food of the Gods": Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans, with Particular Reference to the Impact of Fermentation. *Crit Rev Food Sci* **2011**, *51* (8), 731-761.
74. Hurst, W. J.; Krake, S. H.; Bergmeier, S. C.; Payne, M. J.; Miller, K. B.; Stuart, D. A., Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*.
75. Aculey, P. C.; Snitkjaer, P.; Owusu, M.; Bassompierre, M.; Takrama, J.; Norgaard, L.; Petersen, M. A.; Nielsen, D. S., Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics. *J Food Sci* **2010**, *75* (6), S300-S307.
76. Rivero-Perez, M. D., Muniz, P. y Gonzalez-Sanjose, M. L. , Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *J Agr Food Chem* **2007**, *55*, 5476-5483.
77. Elwers, S.; Zambrano, A.; Rohsius, C.; Lieberei, R., Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229* (6), 937-948.
78. Efraim, P.; Pezoa-Garcia, N. H.; Pereira Jardim, D. C.; Nishikawa, A.; Haddad, R.; Eberlin, M. N., Influence of cocoa beans fermentation and drying on the polyphenol content and sensory acceptance. *Ciencia Tecnol. Aliment.* **2010**, *30*, 142-150.
79. Forsyth, W. G. C., Cacao Polyphenolic Substances .1. Fractionation of the Fresh Bean. *Biochem J* **1952**, *51* (4), 511-516.
80. Arlorio, M.; Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coisson, J. D.; Grosso, E. D.; Minassi, A.; Appendino, G.; Martelli, A., Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem* **2008**, *106* (3), 967-975.

81. Oliviero, T.; Capuano, E.; Caemmerer, B.; Fogliano, V., Influence of Roasting on the Antioxidant Activity and HMF Formation of a Cocoa Bean Model Systems. *J Agr Food Chem* **2009**, *57* (1), 147-152.
82. Bertazzo, A.; Agnolin, F.; Comai, S.; Zancato, M.; Costa, C. V. L.; Seraglia, R.; Traldi, P., The protein profile of *Theobroma cacao* L. seeds as obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (14), 2035-2042.
83. Arlorio, M.; Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coisson, J. D.; Del Grosso, E.; Minassi, A.; Appendino, G.; Martelli, A., Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem* **2008**, *106* (3), 967-975.
84. Serra Bonvehi, J.; Ventura Coll, F., Factors affecting the formation of alkylpyrazines during roasting treatment in natural and alkalized cocoa powder. *J Agr Food Chem* **2002**, *50* (13), 3743-50.

|

ANEJO I



REPUBLICA DE NICARAGUA / REPUBLIC OF NICARAGUA

MINISTERIO AGROPECUARIO Y FORESTAL
DIRECCION GENERAL DE PROTECCION Y SANIDAD AGROPECUARIA
DIRECCION DE SANIDAD VEGETAL
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACION FITOSANITARIA



CERTIFICADO FITOSANITARIO / PHYTOSANITARY CERTIFICATE No. 00128863

A las autoridades Fitosanitarias de: To the Plant Protection Organization (s) of: ESPAÑA		Lugar de Expedición/Place of Issue CENTRAL	
		FAUCA / FUE: FUEMA305430	
		Fecha de Inspección/Date Inspected 03/05/2011	
CERTIFICACION / CERTIFICATION			
Se certifica que las plantas o productos vegetales descritos a continuación han sido inspeccionados de acuerdo a los procedimientos apropiados y han sido considerados libres de plagas cuarentenarias y prácticamente libre de otras plagas dañinas y que se ajustan a las regulaciones fitosanitarias del país importador. This is to certify that the plant products described below have been inspected according to appropriate procedures and are considered to be free quarantine pest, and practically free from other injurious pests, and that they are considered to conform with the current phytosanitary regulations of the importing country.			
TRATAMIENTO DE DESINFECTACION Y/O DESINFECCION / DESINFESTACION AND/OR DESINFECTATION TREATMENT			
1. Fecha / Date		2. Tratamiento / Treatment	
3. Químico (ingrediente activo) / Chemical (active ingredient)		4. Duración y Temperatura / Duration and temperature	
5. Concentración / Concentration		6. Información Adicional / Additional Information	
DESCRIPCION DEL ENVIO / DESCRIPTION OF SHIPMENT			
7. Nombre y dirección del exportador / Name and address of the exporter YADER SALVADOR SUAZO MERCADO BARRIO ALTAGRACIA SEMAFOROS DEL ZUMEN, 2C NORTE, 1C OESTE, 1/2C NOR.		8. Nombre y dirección del consignatario / Declared name and address of the consignee YADER SALVADOR SUAZO M. UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA (U.P.N.A) PAMPLONA-NAVARRA, ESPAÑA	
9. Nombre del Producto y cantidad declarada / Name of product and quantity declared			
1 1801000010 1.00 BLS CACAO EN GRANO ENTERO Y CRUDO. ==== ULTIMA LINEA ====			
10. Nombre botánico / Botanical name 1 Theobroma cacao		11. Número y descripción del envío / Number and description of packages 6.00 KGS.	12. Marcas de distinción / Distinguishing marks S/M
13. Lugar de origen / Place of origin NICARAGUA		14. Medio de transporte declarado / Declared means of conveyance AEREO	15. Puerto y/o puesto de salida / Declared point of exit ADUANA CENTRAL AEREA
Cualquier declaración falsa en este certificado o falsificación del mismo, lo invalida y hace acreedores a los culpables de las penas contempladas en la ley. Este documento queda sin validez en caso de presentar manchas o borrones. Any intentional false statement in this certificate or own falsification, is invalidated and done creditors to blame of penalty by the public law. If this document present any rough copy or blot is invalidated.			
Declaración Adicional / Additional declaration			
Net wt.: 6.00 KGS. M.S.V.C. ESTAS MUESTRAS SON PARA ANALISIS DE LABORATORIO			
16. Fecha de expedición / Date issued 03/05/2011		17. Nombre del funcionario DCF / Name of authorized officer DR. ARMANDO JOSE ROMERO BERMUDEZ	18. Firma del funcionario / Signature of authorized officer
El departamento de certificación Fitosanitaria del MAG-FOR, sus funcionarios y representantes, declinan toda la responsabilidad financiera resultante de este certificado. No financial liability shall attach to the Nicaragua Agricultural Ministry or to nay officer or representative of the Ministry with respect to this certificate.			
http://www.cetrex.gob.ni/		http://www.magfor.gob.ni/	

CETREX-FUEMA305430-2-FIPOJL0-SGJJ0H
ORIGINAL



Anejo I.1. Certificado Fitosanitario de las muestras

ANEJO II

FICHA DE CONTROL DE CALIDAD

No. 0001

0262

Vendedor: Guatemala Tipo: Trinitario Fecha: 29/04/2011

Parámetros	RESULTADO
% de humedad (6-7)	6.04
% fermentado (80)	21.67
% pizarra (0)	36.67
% completamente violeta (2)	31.50
% Ligeramente violeta (4)	4.67
% Moho Interno (1)	0.17
% Sobre fermentado (1)	—
% Granos no fermentados (0)	—
% white spot (0)	—
% Insectos infestación (0)	—
TOTAL	100 %

Aspectos exteriores. Muestra de 400 gramos	Resultado	Calidad Organoléptica	Resultado
% Gemelos (0)	0.33	Toque de cacao (3-6)	0.5
% Sin raíz germinativa (0)	—	Matriz Tostado (2)	0.5
% Germinadas (0)	—	Caramelizado (2)	0.0
% Arrugadas (0)	1.83	Toque Acido	1.0
% Quebrados (0)	0.33	Astringente	0.5
Moho Externo max (8%)	2.83	Amargo	2.5
% Índice de Semilla (IS)	1.32	Leñoso	1.0
% semilla en vaina	76.	Textura embutido ahumado	0.0
		Falso Aroma	0.5
		Afrutado	0.5

Observaciones: Cacao clasificado como Tradicional
calidad Tipo "B"

Origen: Guatemala

No fermentado

Miguel Halarin
Abriel López
Responsables control
Calidad Ritter Sport

[Signature]
Responsable de acopio
Cooperativa

Anejo II.1. Ficha de Control de Calidad CSF

Proyecto de Fomento del Rubro Cacao PPP Ritter Sport, DED, ADDAC-

FICHA DE CONTROL DE CALIDAD

No. 0001

Vendedor: Coop. La Campesina Tipo: Trinitario Fecha: 06/05/2011

Parámetros	RESULTADO
% de humedad (6-7)	6.00
% fermentado (80)	86.00
% pizarra (0)	0.75
% completamente violeta (2)	1.50
% Ligeramente violeta (4)	2.60
% Moho Interno (1)	0.80
% Sobre fermentado (1)	0.35
% Granos no fermentados (0)	0.66
% white spot (0)	0.15
% Insectos infestación (0)	—
TOTAL	100 %

Aspectos exteriores. Muestra de 400 gramos	Resultado	Calidad Organoléptica	Resultado
% Gemelos (0)	0.20	Toque de cacao (3-6)	3.5
% Sin raíz germinativa (0)	—	Matriz Tostado (2)	1.0
% Germinadas (0)	—	Caramelizado (2)	1.0
% Arrugadas (0)	0.75	Toque Acido	1.0
% Quebrados (0)	0.25	Astringente	0.0
Moho Externo max (8%)	1.75	Amargo	1.5
% Índice de Semilla (IS)	98.00	Leñoso	1.0
		Textura embutido ahumado	0.0
		Falso Aroma	0.0
		Afrutado	1.0

Observaciones: Cacao clasificado como: Buen sabor y calidad. Tipo "A"

Origen: Waslala.

fermentado

Miguel Molerpio
Horiel Lopez
Responsables control
Calidad Ritter Sport


Responsable de acopio
Cooperativa



Proyecto de Fomento del Rubro Cacao PPP Ritter Sport, DED, ADDAC-

FICHA DE CONTROL DE CALIDAD

0261
No. ~~0001~~

Vendedor: Guayabo UNAG Tipo: Trinitario Fecha: 28/04/2011

Parámetros	RESULTADO
% de humedad (6-7)	6.0
% fermentado (80)	78.33
% pizarra (0)	-
% completamente violeta (2)	-
% Ligeramente violeta (4)	20.17
% Moho Interno (1)	0.33
% Sobre fermentado (1)	-
% Granos no fermentados (0)	-
% white spot (0)	-
% Insectos infestación (0)	-
TOTAL	100 %

Aspectos exteriores. Muestra de 400 gramos	Resultado	Calidad Organoléptica	Resultado
% Gemelos (0)	-	Toque de cacao (3-6)	2.0
% Sin raíz germinativa (0)	-	Matriz Tostado (2)	0.5
% Germinadas (0)	-	Caramelizado (2)	0.0
% Arrugadas (0)	0.67	Toque Acido	1.0
% Quebrados (0)	0.50	Astringente	1.0
Moho Externo max (8%)	-	Amargo	4.5
% Índice de Semilla (IS)	1.25	Leñoso	1.0
# Semillas en 100gr	81.00	Textura embutido ahumado	0.0
		Falso Aroma	0.0
		Afrutado	0.5

Observaciones: Cacao deshidratado, como convencional
Cacao fermentado

Tipo "C"

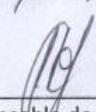
Origen = Guayabo - UNAG

Notas = Prácticas no adecuadas de cosecha y durante la fermentación no se realizan los volteos a tiempos, por aumento de temperatura en la masa de semilla, se cacha al sol muy rápido, por fermentación

Miguel Molinari

Joniel López

Responsables control
Calidad Ritter Sport


Responsable de acopio
Cooperativa

Anejo II.3. Ficha de Control de Calidad CF-BC