



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE LA GRASA

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CACAO, EXTRACCIÓN Y
ESTUDIO DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN GENOTIPOS DEL
BANCO DE GERMOPLASMA DE MÉXICO**

Memoria que presenta D^a Carolina Hernández Hernández para optar al grado de Doctor en:

Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del Desarrollo Rural Sostenible de la
Universidad de Sevilla.

Línea de Investigación:

Tecnología de la producción Vegetal

Sevilla, Noviembre de 2018

La tesis titulada "Análisis de la composición química del cacao, extracción y estudio de compuestos antioxidantes en genotipos del Banco de germoplasma de México" presentada por D^a Carolina Hernández Hernández para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo la Dirección de los Doctores D^a Ana M^a Morales Sillero y D Guillermo Rodríguez Gutiérrez, ambos investigadores de la Universidad de Sevilla y el Instituto de la Grasa respectivamente. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación.

Vo. Bo.

Los directores

Fdo.: Ana M^a Morales Sillero

Fdo.: Guillermo Rodríguez Gutiérrez

A mis padres Fernando y Cresenciana, por guiar mis pasos

Índice

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	viii
1. ABREVIATURAS.....	12
2. RESUMEN	14
3. INTRODUCCIÓN	18
3.1. Historia del cacao	18
3.2. Producción y mercado.....	19
3.2.1. A nivel mundial.....	19
3.2.2. La producción de cacao en México	19
3.3. Condiciones de cultivo	20
3.4. Botánica y morfología	21
3.5. Diversidad varietal.....	22
3.6. El Banco de germoplasma de México	23
3.7. Manejo poscosecha de las semillas de cacao	25
3.7.1 Cosecha y desgrane de las mazorcas	26
3.7.2. Fermentación	26
3.7.3. Secado	27
3.8. Productos y subproductos de la industria del cacao.....	28
3.9. Parámetros de calidad del grano de cacao	32
3.10. Compuestos bioactivos del grano de cacao	33
3.10.1 Fenoles	36
3.10.2 Metilxantinas.....	39
3.10.3. Factores que influyen en la composición de fenoles y metilxantinas del grano de cacao	40
3.11. Extracción de compuestos bioactivos en granos de cacao	41
3.12. La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS).....	43
3.12.1 Fundamentos	43
3.12.2. Aplicaciones.....	46
3.12.3 Aplicación del NIRS en el análisis de la calidad del grano de cacao	47
4. Bibliografía	52
5. OBJETIVOS	67
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69

6.1. Extracción y caracterización de compuestos bioactivos del cacao	72
Capítulo 1: Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. ...	74
6.1.1. Capítulo 1:	75
Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk.....	75
Capítulo 2: Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract.....	98
6.1.2. Capítulo 2:	99
Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract.....	99
Capítulo 3: Extra virgin olive oil jam functionalized with cocoa bean husk extract rich in theobromine and phenols.....	¡Error! Marcador no definido.
6.1.3. Capítulo 3:	¡Error! Marcador no definido.
Extra virgin olive oil jam functionalized with cocoa bean husk extract rich in theobromine and phenols.	¡Error! Marcador no definido.
Extra virgin olive oil jam functionalized with cocoa bean husk extract rich in theobromine and phenols.	¡Error! Marcador no definido.
6.2. Uso de la tecnología de espectroscopía de infrarrojo cercano para la clasificación del cacao en base a parámetros de calidad y de su composición de sustancias bioactivas..	¡Error! Marcador no definido.
Capítulo 4: Feasibility of Near Infrared Spectroscopy for fast classification of intact cocoa beans based on their content of bioactive compounds.....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.1. Capítulo 4:	¡Error! Marcador no definido.
Feasibility of Near Infrared Spectroscopy for fast classification of intact cocoa beans based on their content of bioactive compounds.....	¡Error! Marcador no definido.
Capítulo 5: Near Infrared Spectroscopy for the analysis of bioactive compounds in cocoa bean husk	¡Error! Marcador no definido.
6.2.2. Capítulo 5:	¡Error! Marcador no definido.
Near Infrared Spectroscopy for the analysis of bioactive compounds in cocoa bean husk	¡Error! Marcador no definido.
6.1. Discusión general	¡Error! Marcador no definido.
8. Anexos.....	¡Error! Marcador no definido.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

A todas las instituciones que de una u otra forma contribuyeron con recursos económicos, material, equipo e instalaciones para la realización de esta tesis doctoral:

Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT, México)

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, México)

Instituto de la grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IG, CSIC, España)

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Departamento de Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla (ETSIA, US, España)

Centro Tecnológico del Olivar y el aceite (CITOLIVA, España)

Asociación Local Agrícola de Productores de Cacao de Huimanguillo (ALAPCH, México)

Industria de Cacao de Tabasco Sociedad Anónima (INCATABSA, México)

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a lograr este objetivo en mi vida materializado en esta tesis doctoral. Seguramente el espacio no sería suficiente para alcanzar a nombrar a todas y cada una pero de forma breve puedo enumerar:

A los Doctores D^a Ana M^a. Morales Sillero y D. Guillermo Rodríguez Gutiérrez de la Universidad de Sevilla e Instituto de la Grasa respectivamente, por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo como parte de mi tesis doctoral, por su valioso apoyo tanto en el ámbito personal como profesional.

Al Dr. D. Juan Fernandez Bolaños del Instituto de la Grasa, por su invaluable apoyo y asesoramiento en todos los aspectos a lo largo de estos años, por su confianza y amistad.

Al Dr. D Víctor M. Fernández Cabanás de la Universidad de Sevilla, por su asesoramiento en el desarrollo de los análisis de espectroscopía de infrarrojo cercano.

A todos y cada uno de los compañeros y buenos amigos del Instituto de la Grasa, por conformar un grupo tan ameno de trabajo y haber estado allí en todo momento en los que compartimos desayunos y almuerzos, por escucharme, ayudarme y compartirme sus conocimientos cuando lo he necesitado.

A Olivia Cruz, Dra. Isabel Vieira y Carmen Reginfo por su gran apoyo en la realización de los diferentes análisis de laboratorio.

A todos los compañeros y personal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola, por su apoyo y compañía en todo momento, en especial a Elena Coyago y a Mercedes Roncero por los buenos momentos compartidos.

Al personal del Centro Tecnológico del olivar y el aceite por su amabilidad y buena acogida durante los meses de mi estancia, en especial a la Dra. Ma. Paz Aguilera Herrera por su asesoramiento para la realización de los análisis sensoriales.

A todos mis compañeros y amigos, personal directivo, técnico y científico del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo experimental Huimanguillo, por su disposición a apoyarme y tenderme una mano siempre que lo he necesitado. En especial a las personas de quienes he aprendido mucho sobre el cultivo de cacao: M.C. Alejandro López Andrade y M.C. Miguel Ángel Ramírez Guillermo.

Agradecimientos

Al Dr. Alfonso Azpeitia Morales del INIFAP C.E. Huimanguillo, por su apoyo en la obtención del material vegetal con el que se realizó parte de éste trabajo.

A la Dra. Leobarda Guadalupe Ramírez, Dr. Marcos Vázquez, Dr. Teodoro Espinosa Solares y Dra. Diana Guerrero por su apoyo moral, sus consejos y amistad en todo momento.

A mis entrañables amigos y compañeros de estudios de la Universidad Autónoma Chapingo y Colegio de Posgraduados, que no los nombro a todos por no omitir alguno, pero están siempre en mis recuerdos.

A mi familia en especial a mis padres Fernando y Cresenciana, mis hermanos Salvador, Noelia y Héctor, mis sobrinos Jesús Adael, José Fernando y Christian, gracias por llenar mi vida de amor y alegría y ser mi apoyo y motor.

A José Ramón Rufo, gracias por tu cariño, soporte y compañía durante estos años juntos y los que vengan, por los momentos agradables, por integrarme a tu familia y hacerme sentir parte de ella.

1. Abreviaturas

1. ABREVIATURAS

BCCCA	Biscuit, Cake, Chocolate and Confectionery Alliance (Alianza de bizcochos, pasteles, chocolate y confitería)
CBH	Cocoa Bean Husk (Cascarilla del grano de cacao)
CSIC	Consejo Superior de Ciencia y Tecnología (España)
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México)
DAD	Diode Array Detector (Detector de red de diodos)
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
EC₅₀	Effective concentration at 50% (Concentración efectiva al 50 %)
EVOO	Extra Virgin Olive Oil (Aceite de Oliva Virgen Extra)
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
FT	Fourier Transformed (Transformada de Fourier)
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	High Density Lipoproteins (Lipoproteínas de alta densidad)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)
ICCO	International Cocoa Organization (Organización Internacional del Cacao)
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)
LDL	Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de baja densidad)
NIRS	Near Infrared Spectroscopy (Espectroscopía de Infrarrojo cercano)
PCR	Principal Components regression (Regresión de componentes principales)
PLS	Partial Least Square (Mínimos cuadrados parciales)
UV	Ultraviolet (Ultravioleta)

2. Resumen

2. RESUMEN

El cacao, es un cultivo perenne ampliamente cultivado en regiones tropicales, entre las latitudes 10°N y 10°S a partir del Ecuador (ICCO, 2018). La producción de grano de cacao seco alcanzó en el año 2013 los 4,2 millones de toneladas, lo cual generó en valor 11,8 billones de dólares (FAOSTAT, 2018), y se prevé un crecimiento del 3,1 % hasta el 2019. En México, la producción de cacao presenta un gran potencial y también muestra una tendencia ascendente, ya que desde el año 1960 hasta el 2013 el crecimiento ha sido del 37 % y en los próximos años se prevé un incremento del 0,5% anual. En ambos casos este crecimiento en la producción de cacao responde al incremento de la demanda a nivel mundial de los productos derivados.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) inició en 1981 un programa de mejora genética del cacao, a través del cual se han establecido, en un Banco de Germoplasma, variedades de origen internacional así como híbridos nacionales. En la actualidad se dispone de algunas selecciones de genotipos en base al potencial productivo, rendimiento en grasa del cotiledón y calidad sensorial, todas con ciertos niveles de tolerancia a enfermedades que actualmente están afectando de forma negativa al cultivo, como son la mancha negra y la moniliasis. No obstante, los estudios relacionados con la calidad del cacao y el valor agregado de los mismos han sido escasos hasta la fecha.

Factores como la variedad (genética), ambiente, técnicas de cultivo y el proceso de fermentación influyen en la composición del cotiledón y la cascarilla del cacao. Los parámetros de calidad son diversos: además del peso, el contenido en grasa, proteína y azúcares, el cacao y sus productos derivados destacan por la riqueza en diversos compuestos bioactivos, dentro de los cuales se pueden mencionar los compuestos fenólicos, como los flavanoles y las metilxantinas, que han sido asociados con numerosos beneficios para la salud en la prevención y tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes, la presión arterial y neurodegenerativas. Además, tanto los fenoles como las metilxantinas tienen también importancia en el desarrollo del sabor y aroma del cacao y sus productos derivados. La mayoría de estos estudios han sido realizados en muestras de cotiledón, sin embargo algunos trabajos recientes señalan también el potencial de la cascarilla, el principal sub-producto de la industria del cacao, a menudo considerado como un desecho, como una interesante fuente de fibra dietética y de compuestos bioactivos.

2. Resumen

El objetivo principal del presente trabajo ha sido poner a punto herramientas analíticas para la identificación, cuantificación y extracción de compuestos bioactivos en los componentes del grano de cacao fermentado y seco, el cotiledón y la cascarilla.

Para el logro de este objetivo, se procedió a la determinación de la calidad de dichos componentes en 85 muestras de granos fermentados y secos. Dichas muestras se obtuvieron a partir de 62 genotipos de cacao establecidos en los campos experimentales del Banco de Germoplasma de cacao de México, y fueron cosechadas a lo largo de tres años (2014, 2015 y 2016). Además del peso de grano y su contenido de cascarilla, se han analizado los contenidos en grasa y proteína y se han identificado y cuantificado los azúcares totales, mediante el método de antrona, los fenoles totales, usando método de Folin-Ciocalteu, los fenoles individuales y la teobromina mediante HPLC-UV, y la actividad antioxidante, mediante el método de DPPH. Por otro lado, se compararon distintos métodos de extracción de compuestos bioactivos tanto en muestras de cotiledón seco desgrasado como en las de cascarilla, variando el tipo de solvente, el pH y la temperatura. De esta comparación se ha seleccionado una mezcla de metanol: agua 80:20 a pH 3 y temperatura de 70°C como el método más efectivo para la extracción y cuantificación de dichos compuestos. Dado el potencial de la cascarilla como fuente de compuestos bioactivos, así como la necesidad de revalorizar este subproducto de la industria del cacao, se ha puesto a punto un método que permite la obtención a nivel industrial de un extracto rico en azúcares, fenoles y teobromina. En concreto, el estudio de la extracción con agua con diferentes condiciones de tiempo y temperatura, ha permitido identificar la extracción a 170°C durante 30 minutos como el más efectivo y desarrollar un método para la obtención de un extracto rico en compuestos bioactivos a nivel industrial. Este tratamiento se aplicó a un lote de cascarilla suministrado por una industria con la finalidad de obtener el extracto con y sin ser posteriormente encapsulado con maltodextrina, el cual se adicionó a un alimento elaborado a partir de una mezcla de agua, aceite, azúcar y goma xantana. Se eligió un sistema heterogéneo al ser uno de los más usados industrialmente en la elaboración de nuevos alimentos, y como aceite el aceite de oliva virgen extra para estudiar sus propiedades en este tipo de matriz. De este experimento se determinó que el extracto adicionado mejoró la estabilidad y actividad antioxidante del alimento formulado a través de la solubilización de fenoles totales, teobromina y epicatequina tanto en la fase acuosa como en la fase oleosa.

Finalmente, se ha explorado el potencial de la tecnología NIRS para la determinación de la calidad del grano de cacao, con especial énfasis en los compuestos bioactivos. Esta tecnología es cada vez más utilizada en los laboratorios y en la industria

2. Resumen

agroalimentaria por sus numerosas ventajas, entre otras la rapidez y bajo coste del análisis, fácil manejo y escasa o nula preparación de la muestra. Permite, además, analizar simultáneamente múltiples constituyentes de una misma muestra, y es una técnica no destructiva, limpia y respetuosa con el medio ambiente. En concreto, se han estudiado y comparado las correlaciones de los diferentes datos de laboratorio obtenidos en cotiledón y en cascarilla con los espectros recogidos previamente en un equipo Foss-NIR System 6500 en diferentes tipos de muestras: grano intacto, grano sin cascarilla (cotiledón), cotiledón molido y cascarilla intacta. Los modelos de calibración obtenidos para el estudio de la composición del cotiledón a partir de los espectros de grano sin cascarilla y cotiledón molido han dado mejores resultados que los obtenidos a partir de grano intacto. No obstante, los resultados permiten deducir el potencial de la tecnología NIRS para la clasificación rápida de granos intactos de cacao según el contenido de cascarilla y los contenidos de proteína y compuestos bioactivos como la teobromina, azúcares totales, fenoles totales, catequina y derivados de epicatequina. Se propone, por tanto, su aplicación para la evaluación de genotipos en un banco de germoplasma y/o programa de mejora. En la cascarilla, los contenidos en fenoles totales, azúcares totales y teobromina se pueden predecir con elevado grado de exactitud no solo a partir de los espectros de la cascarilla sino también de los espectros de grano intacto. Estos resultados convierten a la tecnología NIRS en una herramienta de análisis muy interesante para la revalorización de este subproducto en la industria.

3. Introducción

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Historia del cacao

El cacao, designado *Theobroma Cacao* en el siglo XVIII por el botánico Carlos Linneo, es un importante cultivo neotropical, de hoja perenne, en el que se basa la industria del chocolate. Se cree que la planta del cacao tiene su origen en la cuenca del río Amazonas en Sudamérica debido a la enorme diversidad y variación en caracteres morfológicos y fisiológicos encontrada en esta zona. Los olmecas, pertenecientes a la cultura mesoamericana, fueron los primeros en domesticar el cultivo, seguidos por los mayas y a continuación los toltecas y aztecas (Coe & Coe, 1996). Las culturas precolombinas solían usar los granos de cacao como moneda y los aztecas preparaban una bebida amarga denominada 'xocolatl' a partir de la fermentación, secado y opcionalmente el tostado y molido de los granos, y la posterior mezcla con agua y especias como la vainilla y el chile (Presilla, 2001).

Los españoles fueron los primeros europeos en probar la bebida del chocolate después de la conquista del imperio azteca en México durante el siglo XVI (Beg, Ahmad, Jan, & Bashir, 2017). A esta le añadieron azúcar y la sazonaron con canela y otras especias para hacerla más agradable al paladar (Wood & Lass, 2001). Este tipo de bebida se hizo popular en Europa, primero en España y más tarde en Italia, Flandes, Francia e Inglaterra. Tras la conquista, el cultivo también se expandió hacia Sudamérica y el Caribe, siendo Venezuela uno de los primeros países donde se desarrolló (Wood & Lass, 2001). Por la misma época (s XVI), cruzó el océano Pacífico instalándose primero en Filipinas y más tarde en las islas Sulawesi y Java (Indonesia), así como en Sri Lanka e India.

Durante los siglos XVI y XVII casi la totalidad de la producción de cacao era del tipo Criollo. En el siglo XVIII el cacao se comenzó a cultivar en Brasil y Ecuador, y a la producción se le dio el nombre de Forastero. Después de la independencia de Brasil, en 1822, el cacao de este tipo, también denominado amelonado, fue llevado desde el estado brasileño de Bahía hasta Santo Tomás, en el estado de Rio Grande, de allí a Fernando Po ubicado en Guinea Ecuatorial (África) y finalmente, hacia finales del siglo XIX, a Ghana y Nigeria para asentarse el cultivo en el oeste de África.

3.2. Producción y mercado

3.2.1. A nivel mundial

De acuerdo a la Fundación Mundial del Cacao (WCF son sus siglas en inglés), a nivel mundial se producen 4,2 millones de toneladas valoradas en 11,8 billones de dólares (Beg et al., 2017). Los principales países productores en 2013 fueron Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brasil, Camerún, Ecuador y Malasia, contribuyendo respectivamente con el 39,8%, 21,1% y 9,8% los tres primeros. El número de productores es próximo a los seis millones y los ingresos de 40 a 50 millones de personas dependen de la producción (FAOSTAT, 2018).

En relación a la demanda de cacao, el aumento es significativo desde hace años y se espera que continúe debido en particular a la industria del chocolate. Solo entre los años 1961 y 2014 la demanda aumentó un 72%, alcanzando los 4,3 millones de toneladas, y se prevé un crecimiento del 3,1% desde 2014 hasta 2019 (Beg et al., 2017; ICCO, 2018). Los países líderes globales en la elaboración de los productos del cacao son Reino Unido, Ghana, Costa de Marfil, Bélgica y Suiza, por este orden. Actualmente, los países que tienen un mayor consumo per cápita de chocolate son Suiza, Alemania, Noruega, Austria y Reino Unido con 10,6, 9,7, 9,3, 8,2 y 8.0 kg respectivamente (Afoakwa, 2011). El mayor mercado del chocolate se perfila en el futuro hacia Norteamérica, Oriente Medio y la región de Asia-Pacífico (Baah & Anchirinah, 2011).

3.2.2. La producción de cacao en México

En el año 2013, ocupó el séptimo lugar en la producción mundial de cacao, con un volumen de 82.000 toneladas. La superficie plantada fue en el mismo año de 70.000 hectáreas concentrada fundamentalmente en los estados de Tabasco y Chiapas, en los que se produce 63,7 y 35,3 % de la producción total anual, respectivamente (FAOSTAT, 2018). Otros estados productores en menor proporción son Oaxaca y Guerrero. No obstante la baja producción actual con respecto a otros países productores, se observa una tendencia al incremento a la producción que desde el año 1961 al 2011 se ha incrementado en un 36,6 % y se prevé un crecimiento del 0,5% anual para los próximos años (actualix.com, 2016). Esto en respuesta al incremento de la demanda y a que se tienen detectadas la existencia de zonas con las condiciones idóneas para su cultivo (Figura 1). Los productores de cacao comercializan el grano, generalmente en fresco, a través de asociaciones que cuentan con la infraestructura para fermentarlo y secarlo, o bien al sector privado, representado por empresas como

3. Introducción

Agroindustrias Unidas del Cacao (AMCO) e IMCO. Este cacao es vendido posteriormente a las empresas transnacionales (Nestlé y Hersheys, entre otras) que fabrican los productos a base de cacao que llegan al consumidor final. Aproximadamente solo el 5% de la producción se procesa y comercializa como chocolate dentro de las regiones productoras (Ocampo, Ríos & Soria, 2012).



Figura 1. Estados productores actuales y con potencial de producción de cacao en México.

3.3. Condiciones de cultivo

El cacao se cultiva en el trópico, principalmente entre las latitudes 10°N y 10°S, a altitudes por debajo de los 294 m, y en condiciones de elevada humedad y calor. La temperatura media diaria varía desde los 18 a 30°C y la precipitación mínima anual suele ser de 1500 mm. Los suelos son en su mayoría de tipo arenosos con una profundidad media de 1,5 m, lo que favorece el buen desarrollo radicular. Se trata de suelos con un pH que varía entre 5 y 7,5, con alto contenido de materia orgánica (3,5 % en los últimos 15 cm de suelo) y ricos en potasio y nitrógeno (Badrie, Bekele, Sikora, & Sikora, 2015).

El promedio de vida de una plantación de cacao es de 30 a 40 años, si bien lo normal es que los árboles se arranquen a los 25 años. Estos deben protegerse de la exposición solar directa y del viento. En los primeros años de una plantación es frecuente cultivarlos a la sombra de otros árboles, como por ejemplo los bananos. En

3. Introducción

las plantaciones adultas, el árbol de cacao se protege con árboles de determinadas especies de leguminosas, como las gliricidias y eritrinas, que les proveen una sombra moderada (Somarriba & Calvo, 1998). Las plantaciones de cacao comunes tienen una densidad de plantación desde 1000 a 1200 árboles por hectárea (Figura 2), aunque recientemente se ha sugerido la plantación en alta densidad (1736-2500 árboles por hectárea) como forma de optimizar la producción (Badrie et al., 2015). La reproducción vegetativa por medio de injerto es una práctica común en las plantaciones, debido a las ventajas que brinda, como la homogeneidad de la plantación y la precocidad en la floración y fructificación. Así, por ejemplo en el caso de México, se recomienda injertar sobre patrón franco de IMC-67 o bien de la variedad amelonado (López-Andrade et al., 2013).



Figura 2. Plantación de cacao en fructificación (Tabasco, México).

3.4. Botánica y morfología

Theobroma cacao es una especie de hoja perenne, de la familia Malvaceae, que se subdivide en dos subespecies: *T. cacao* spp. cacao que engloba el cacao Criollo y *T. cacao* spp. sphaerocarpum, que incluye todas las demás poblaciones (Cuatrecasas, 1964).

El árbol de cacao crece hasta cinco metros en tres años y puede alcanzar hasta los ocho metros en diez años. La entrada en producción es lenta, comienza a fructificar entre los dos y cinco años dependiendo de la variedad y forma de cultivo. La cosecha de mayor importancia suele darse en una temporada a lo largo de tres meses durante el otoño e invierno y una segunda cosecha de menor importancia seis meses después,

3. Introducción

aunque la fructificación se da a lo largo de todo el año. Sus flores son pequeñas, de aproximadamente 15 mm de diámetro, y se desarrollan en los troncos y ramas principales de los árboles que tienen dos, tres o más años de antigüedad. Se desprenden de largos pedicelos y están compuestas por cinco sépalos, cinco pétalos, 10 estambres y un ovario con cinco unidades de carpelos (Figura 3a). Los frutos son bayas indehiscentes que comúnmente se denominan mazorcas, generalmente de forma ovoide terminada en punta, un color que varía de amarillo a naranja según la variedad y un peso medio de 0,5 kg (Hardy, 1961; López-Baez, 1995). Contienen en el interior cinco lóculos y en cada uno hay de cinco a doce semillas embebidas en una pulpa mucilaginosa agrídulce (un fruto puede contener de 20 a 60 o más semillas en su interior) (Figura 3b). Los granos de cacao son las semillas una vez que pasan por las etapas de fermentación y secado (Badrie et al., 2015).

Las semillas de cacao tienen un tamaño aproximado de 2x1 cm y están constituidas por dos cotiledones y un embrión (Figura 3c). El endospermo es muy reducido y toma la forma de una membrana conocida como testa, que posteriormente en el grano se constituye la cascarilla. Las semillas no tienen endodormancia. El mucílago que las rodea contiene un inhibidor que impide la germinación dentro de las mazorcas, pero una vez que estas se abren el mucílago se descompone rápidamente dando comienzo a la germinación (Wood & Lass, 2001).



Figura 3. Flores (a), frutos con semillas cubiertas por mucílago (b) y semillas de cacao (aspecto interno) (c)

3.5. Diversidad varietal

Las plantaciones de cacao existentes alrededor del mundo se basan fundamentalmente en el cultivo de variedades tradicionales. Solo un tercio del cacao que se cultiva comprende híbridos y clones desarrollados en programas de mejora

3. Introducción

genética iniciados en países productores como Trinidad, Costa de marfil, Brasil y Malasia, entre otros (Eskes & Lanaud, 2001).

Tradicionalmente se han reconocido tres grandes clases, tipos o variedades de cacao: Criollo, Forastero y Trinitario. El cacao 'Forastero', término que significa exótico, fue inicialmente utilizado en Venezuela para definir el tipo de cacao introducido desde Trinidad en 1825. El cacao Forastero cultivado en Ecuador, Brasil y occidente de África, se describe como forastero amazónico (Wood & Lass, 2001). Las variedades del tipo Trinitario proceden de cruzamientos entre los tipos Criollo y Forastero amazónico (Cheesman, 1944; Wood and Lass, 2001). Es un grupo muy heterogéneo debido a su origen y se distribuye en toda la zona del Caribe, Centroamérica y donde quiera que haya una mezcla de germoplasma Criollo y Forastero amazónico (Purseglove, 1988; Wood & Lass, 2001). Hoy día, en el 95 % de las plantaciones de cacao predominan árboles de los tipos Forastero Amazónico y Trinitario; el restante 5% pertenecen al tipo Criollo (Badrie et al., 2015; ICCO, 2018). En México, la mayor parte de los productores (82 %) cultivan solo cacao forastero, el 13 % cultivan cacao Criollo asociado con Forastero y Trinitario, y un 5% solo cultiva el tipo Criollo (Avendaño et al., 2011).

Los granos de cacao delos tipo Criollo y Trinitario son reconocidos a nivel mundial como finos de aroma por sus sabores especiales afrutados, especias, caramelo, nueces y vainilla, por lo que se suelen clasificar como cacao de calidad mayor (Eskes & Lanaud, 2001). Los frutos del cacao Criollo son puntiagudos, de superficie rugosa, y cáscara delgada, aunque también pueden ser lisos y de forma pentagonal. El color de los cotiledones es blanco o ligeramente púrpura debido a la ausencia o baja concentración de antocianinas. Los frutos del cacao forastero tienen ápice obtuso y superficie lisa; la forma varía entre oblonga y amelonada. Los granos son pequeños, aplanados y los cotiledones tienen un color púrpura. Además, tienen un sabor fuerte (amargo y astringente) y mayor contenido de grasa que los del tipo Criollo, lo que los hace más atractivos en el mercado (Badrie et al., 2015). Los frutos de cacao del tipo Trinitario son de cáscara resistente como el forastero y de sabor suave como el Criollo, tienen una cáscara semirrugosa y su forma suele ser ovalada de ápice agudo, acuminado u obtuso. Los cotiledones son de color rosado o púrpura claro, de sabor menos amargo y astringente que los del tipo forastero (Álvarez, Pérez & Lares, 2002).

3.6. El Banco de germoplasma de México

A nivel mundial, existen diversos bancos de germoplasma de cacao, fundamentalmente en los países productores. Así, por ejemplo, hoy en día se dispone

3. Introducción

en Brasil de al menos cinco colecciones de cacao, establecidas en diferentes estados, que suman un total de 3502 accesiones; en Colombia se preservan 746 accesiones en y en Costa Rica se conserva una colección de 700 accesiones. Otros países que mantienen importantes colecciones de accesiones de cacao son Trinidad y Tobago, Estados Unidos, Cuba, Costa de Marfil, República Dominicana, Ecuador, Honduras, India, México, Nicaragua, Perú, Sierra Leona, Venezuela y Vietnam (Encina et al. 2018). Países como Brasil, Costa Rica y Estados Unidos, cuentan además con programas de mejora genética que tienen como objetivo principal la obtención de genotipos resistentes a enfermedades que afectan al cultivo cacao, como la mancha negra, moniliasis y escoba de bruja, enfermedades provocadas por los hongos *Phytophthora spp.*, *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* respectivamente. El alto rendimiento agronómico, la alta calidad industrial y sensorial son también caracteres deseables en estos programas de mejora (Badrie et al., 2015; Phillips-Mora, Arciniegas-Leal, Mata-Quirós, & Motamayor-Arias, 2012).

El origen del Banco de Germoplasma de México se remonta a 1945. Se encuentra actualmente en los campos experimentales que posee el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Rosario Izapa, en el Estado de Chiapas, y en Huimanguillo, en el Estado de Tabasco. En Rosario Izapa se conservan in situ accesiones procedentes de diferentes regiones y países, que han sido previamente propagados mediante métodos de reproducción vegetativa. En concreto, se dispone de 176 accesiones, algunas procedentes de otras regiones de México y otras de siete países de América Latina: Perú, Brasil, Costa Rica, Trinidad, Colombia, Venezuela y Guatemala. En el centro ubicado en Huimanguillo (Tabasco), se tienen establecidas un total de 157 accesiones, las cuales son prácticamente una réplica de las de Rosario Izapa. Hasta la fecha se han realizado algunos estudios relacionados con la caracterización morfológica y molecular, el estudio del comportamiento agronómico, la producción y calidad del grano, que han permitido seleccionar genotipos en base al alto potencial productivo (> 1 tn/ha), la elevada calidad sensorial del grano, y también ciertos niveles de tolerancia a enfermedades que actualmente están afectando de forma negativa al rendimiento del cultivo, como son la mancha negra y la moniliasis (Avendaño et al., 2011).

En el año 2012, se inició un programa de mejora genética en el que participan investigadores de la Universidad Autónoma de Chiapas y del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, y en el que colaboran diversos productores de cacao. El objetivo es la selección y posterior reproducción vegetativa de genotipos por su alto rendimiento en producción, resistencia a enfermedades, porte

3. Introducción

y vigor de los árboles, y cierto porcentaje de granos con cotiledón blanco en la mazorca. A la par de este trabajo, investigadores del INIFAP C.E. Huimanguillo llevan a cabo estudios de mejoramiento genético enfocados en el desarrollo de nuevos híbridos mexicanos altamente productivos y resistentes a la enfermedad de moniliasis (Barrón-García et al., 2014; Azpeitia-Morales, et al., 2017) .

3.7. Manejo poscosecha de las semillas de cacao

En la Figura 4 se muestran las diferentes fases del manejo poscosecha en las regiones productoras de México. Este se inicia tras la recolección de las mazorcas e incluye el desgrane, la fermentación y el secado de las semillas, y finaliza con el envasado y almacenamiento del grano seco fermentado. A continuación se describe con más detalle cada una de las fases.



Figura 4. Esquema del manejo poscosecha del cacao en el Estado de Tabasco, México

3.7.1 Cosecha y desgrane de las mazorcas

El desarrollo del fruto o mazorca y su posterior maduración suele producirse a lo largo de seis meses. La cosecha de las mazorcas en estado de madurez óptima se realiza de forma manual con la ayuda de una cuchilla tipo hoz o bien de tijeras de poda dependiendo de la posición del fruto en el árbol (Figura 4). Los índices de maduración que suelen emplearse son el cambio de coloración de la superficie del fruto y el sonido que se produce al golpearlos con los dedos una vez que la placenta se desprende de la cáscara (Wood and Lass, 2001).

3.7.2. Fermentación

La semilla de cacao fresca, recién cosechada, no contiene los compuestos que determinan el sabor y el aroma del chocolate, por lo tanto, el manejo poscosecha, en especial las etapas de fermentación y secado, es esencial para la óptima formación de los precursores (Hashim, Selamat, Syed Muhammad, & Ali, 1998). Después de la cosecha, las semillas se extraen de forma manual de las mazorcas en la misma plantación. Posteriormente son transportadas a las naves de fermentación, donde se lleva a cabo esta etapa a gran escala. Las semillas se colocan en contenedores de madera de 1.000 kg de capacidad, donde comienza de forma espontánea una fermentación microbiana (Nigam & Singh, 2014). La fermentación en cajas y artefactos de madera (Figura 4) es una práctica común en las regiones de Centro y Sudamérica así como en el sur de Asia; en la zona productora del oeste de África, esta suele llevarse a cabo en montones apilados en el suelo y protegidos con hojas de plantas del género *musa* (Tomlins, Baker, Daplyn, & Adomako, 1993).

La fermentación suele durar seis o siete días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad del ambiente. Al principio es de tipo alcohólico y se produce en ausencia de oxígeno (fase es anaerobia). Los organismos predominantes son las levaduras y las bacterias lácticas que generan metabolitos como etanol y ácidos orgánicos. Debido a que la fermentación alcohólica es una reacción exotérmica, en esta fase la temperatura en la masa aumenta por encima de los 40°C. Estas condiciones dan lugar a la muerte del embrión, lo que impide la germinación de las semillas y desencadena una matriz de reacciones bioquímicas endógenas que producen los precursores del sabor y el aroma del chocolate (Barel, 1997). Al mismo tiempo, los polisacáridos presentes en las células de la pulpa mucilaginosa se degradan por la acción de enzimas pectinolíticas liberadas por las levaduras (Sánchez et al., 1985).

3. Introducción

La ausencia del mucílago favorece el desarrollo posterior de bacterias ácido-acéticas en presencia de oxígeno (fase aerobia). Dichas bacterias convierten el etanol producido durante la fermentación alcohólica en ácido acético mediante una reacción de oxidación altamente exotérmica que provoca el incremento de temperatura hasta los 50°C (Lagunes-Gálvez, 2002). La remoción constante de la masa de fermentación es necesaria para promover la aireación además de favorecer un proceso homogéneo. (Hernández-Hernández, López-Andrade, Ramírez-Guillermo, Guerra Ramírez, & Caballero Pérez, 2016; Lagunes Gálvez, Loiseau, Paredes, Barel, & Guiraud, 2007; Nigam & Singh, 2014).

El tiempo de almacenamiento de la mazorca y las condiciones de fermentación influyen en la calidad del grano. Así, por ejemplo, de acuerdo con estudio realizado por Afoakwa et al., (2011) los contenidos de proteína y grasa fueron superiores en los granos sin fermentar. Los contenidos de micronutrientes también disminuyeron con la fermentación pero aumentaron con el tiempo de almacenamiento.

3.7.3. Secado

Una vez finalizada la fermentación, se procede al secado de los granos de cacao hasta alcanzar una humedad del 7 %. Por debajo de este contenido de humedad se incrementa el riesgo de fractura de la cascarilla y del cotiledón; por el contrario, un mayor contenido puede provocar el desarrollo de moho y bacterias (European Cocoa Association, CAOBISCO, & Federation of Cocoa Commerce, 2015). El secado puede llevarse a cabo de forma natural, a menudo bajo estructura de invernadero y en suelo de hormigón (Figura 4), o bien de forma artificial en estructuras de hormigón en las que se introduce aire a altas temperaturas (>60°C). Los productores en pequeña escala prefieren utilizar el secado natural ya que les implica un menor gasto. Sin embargo, en las naves de fermentación a gran escala, el secado suele llevarse a cabo de forma artificial (Hii, Law, & Cloke, 2009). En la Figura 5 se muestra la apariencia interna y externa de los granos fermentados y secos.



Figura 5. Apariencia externa (a) e interna (b) del grano de cacao seco y fermentado

3.8. Productos y subproductos de la industria del cacao.

En esquema de la Figura 6, elaborado de acuerdo a Okiyama et al. (2017), se puede ver cómo se obtienen los diferentes productos de cacao a partir del grano seco. El proceso consiste en diferentes etapas y comienza por la limpieza de los granos que permite separar la materia extraña. Los granos limpios son posteriormente tostados o bien sometidos a un pre-tratamiento térmico con la finalidad de continuar con las reacciones que dan lugar al desarrollo de los compuestos relativos al sabor y aroma del chocolate que se han iniciado previamente en las etapas de fermentación y secado. A continuación se procede al rompimiento de los granos y posterior separación de la cascarilla y el embrión. Los granos quebrados se someten a la molienda de la cual se obtiene la pasta de cacao de cuyo prensado se separa la manteca, un producto final que se almacena para después comercializarlo a las diferentes industrias que lo demandan, como la alimentaria y la farmacéutica. La torta de cacao se puede someter nuevamente a prensado para pulverizarla, lo que da lugar al denominado polvo de cacao o cocoa, que se comercializa principalmente en la industria alimentaria para la elaboración de chocolate en polvo, chocolate macizo, galletas y confitería. Los diferentes aprovechamientos de los productos del cacao se indican en la Tabla 1.

La cascarilla es el principal subproducto de la industria del cacao. Ha sido generalmente subutilizada o directamente considerada como un desecho (Okiyama et al., 2017). Se estima que representa entre el 12 al 20% del peso total del grano, por lo que si se tiene en cuenta que la producción mundial de cacao supera los 4.200.000 t, se generan al año más de 800.000 t de cascarilla (ICCO, 2018).

3. Introducción

En los últimos años el valor agregado de los residuos industriales ha ido ganando importancia debido a la escasez de recursos naturales y a los problemas ambientales que ocasionan. Son diversos los estudios llevados a cabo para valorizar los subproductos obtenidos en las industrias asociadas a la transformación de frutos como, por citar algunos casos específicos, la naranja, mango (Okino Delgado & Fleuri, 2016), piña, papaya (Cheok et al., 2016), café (Murthy & Naidu, 2012) y aceituna de almazara (Rubio-Senent, Rodríguez-Gutiérrez, Lama-Muñoz, & Fernández-Bolaños, 2013), en los que se destaca su potencial como fuentes de compuestos bioactivos. En este sentido, diversos trabajos se han centrado recientemente en el estudio de la composición y propiedades de la cascarilla de cacao. Este subproducto tiene un alto contenido proteico (>12 g/100g), contiene todos los aminoácidos esenciales y ha sido recomendado como fuente de fibra dietética en productos de confitería, aperitivos y productos de panadería con alto contenido de fibra y bajo valor calórico. En los últimos años también se está poniendo de manifiesto el interés de la cascarilla de cacao por los contenidos en compuestos fenólicos (catequina y epicatequina en particular) y en metixantinas (teobromina y cafeína). Dichos compuestos proceden de la migración por solubilización desde el cotiledón durante la etapa de fermentación del cacao (Nazaruddin, Seng, Hassan, & Said, 2006), se consideran bioactivos por su poder antioxidante y con probados efectos positivos sobre la salud (Arlorio et al., 2005; Lecumberri et al., 2007; Okiyama et al., 2017). En la Tabla 2 se indican los diferentes usos actuales (elaboración de piensos, fertilizantes, extracción de pigmentos, etc.), y el aprovechamiento potencial de la cascarilla de cacao (como fuente de fibra dietética rica en compuestos bioactivos, carbón activado, saborizante, etc.).

Otros subproductos de la industria del cacao son la cáscara de la mazorca de cacao, que puede aprovecharse como fuente de pectinas, jabones y fertilizantes, y el mucílago que se puede aprovechar en la preparación de bebidas refrescantes y en la elaboración de mermeladas y compotas (Yanes, 1994).

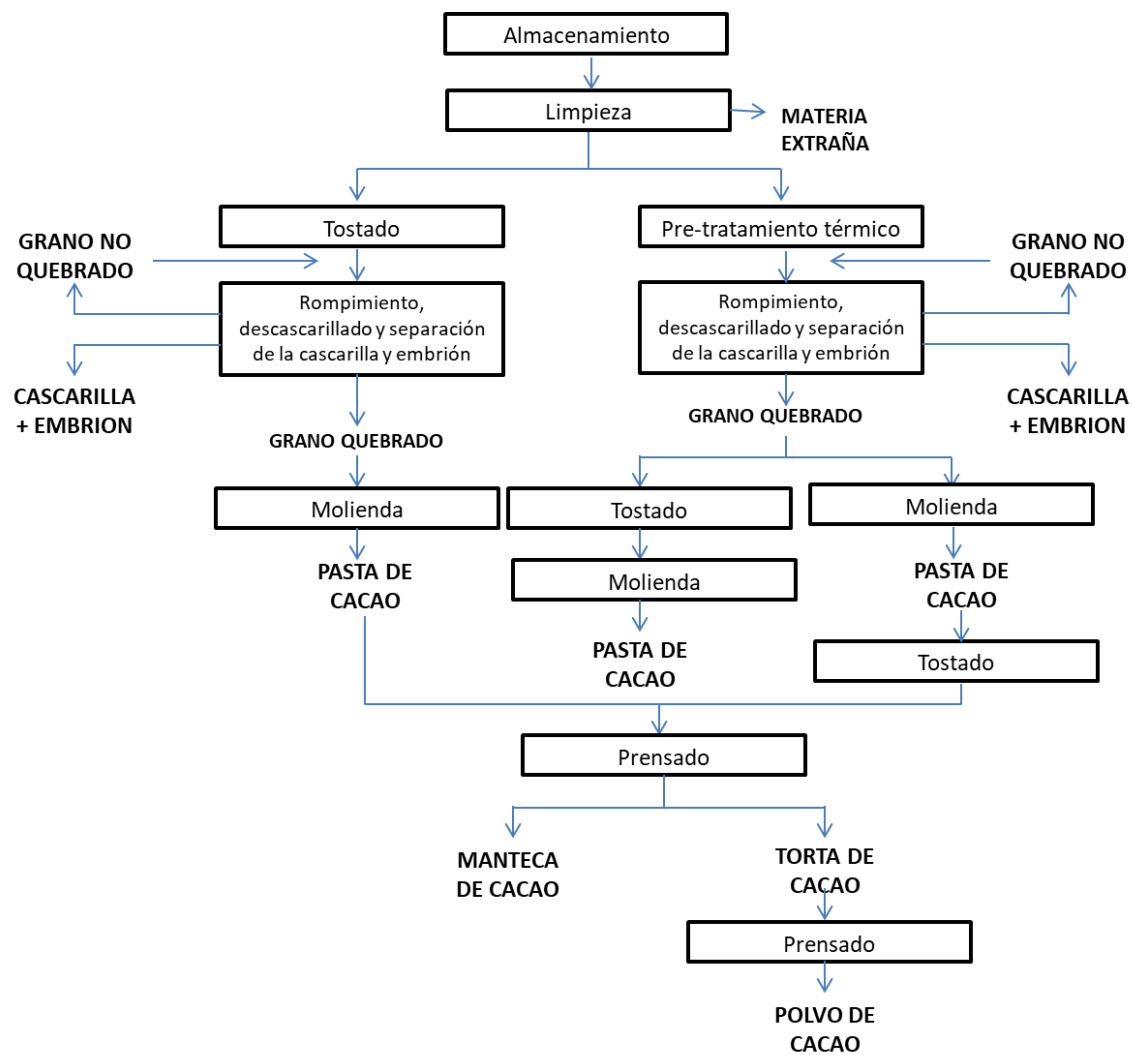


Figura 6. Esquema del procesamiento del cacao (adaptado de Okiyama et al., 2017)

3. Introducción

Tabla 1. Aprovechamiento de los productos obtenidos en la industria de transformación a partir del grano de cacao.

Producto	Usos	Industria	Referencia
Polvo de cacao / Cocoa	Chocolates macizos	Alimentaria	Yanes, 1994; Afoakwa, 2010
	Chocolate en polvo		
	Coberturas		
	Confitería		
Manteca de cacao	Panificación	Alimentaria	Yanes, 1994; Afoakwa, 2010
	Chocolates		
	Coberturas		
	Panificación		
	Helados		
Lubricantes	Medio de soporte	Farmacéutica	Yanes, 1994; Afoakwa, 2010
	Cosméticos		
	Medicamentos		
	Jabones		

Tabla 2. Aprovechamiento de la cascarilla del grano de cacao

Uso	Industria	Estado del uso	Referencia
Piensos	Agricultura	En uso actual	Yanes, 1994
Fertilizante			
Extracción de pigmentos			
Camas para granjas			
Fibra dietética	Alimentaria		
Saborizante	Alimentaria		
Biogás	Bioenergía		
Carbón activado	Tratamiento de agua	En estudio	Okiyama et al., 2017; Panak Balentić et al., 2018
Biomasa de soporte	Tratamiento de efluentes		
Concentrado de fibra con propiedades antioxidantes	Alimentaria		

3.9. Parámetros de calidad del grano de cacao

Los parámetros que determinan el rendimiento industrial del grano y su valor son el peso seco, la presencia de materia extraña, la proporción de cascarilla y el contenido de humedad, además del grado de fermentación, pH, contenido en grasa, contenidos de ácidos grasos libres (AGL), y las características sensoriales (BCCCA, 1996; Sukha et al., 2008).

La industria del cacao suele requerir granos con peso seco superior a 1 g y un contenido de cascarilla alrededor del 11%. La presencia de materia extraña (piedras, plásticos, hojas secas, restos de cáscara del fruto) es indeseable por su influencia negativa en el rendimiento y en el sabor, siendo además una fuente de contaminación. Valores de alrededor del 2% de contenido de materia extraña son aceptables (European Cocoa Association et al., 2015). El contenido de humedad debe rondar el 7%, como se ha comentado anteriormente, ya que por encima de este valor, además de pérdidas materiales se tiene un alto riesgo de contaminación por mohos y bacterias y, por el contrario, una humedad menor provoca la fragilidad de la cascarilla y del cotiledón incrementándose con ello la cantidad de granos rotos. La presencia de granos rotos es una característica indeseable ya que puede dar lugar a un mayor índice de lipólisis al exponerse al oxígeno una mayor superficie de estos, lo que reduce el tiempo que puede ser almacenado.

El grado y la calidad de la fermentación se miden en la denominada prueba de corte. Esta prueba se basa en la inspección visual de 300 granos cortados de forma transversal. La norma ISO (2014) especifica que mediante esta prueba se deben detectar los granos mohosos, pizarrosos, dañados por insectos, germinados y planos.

El alto contenido en grasa es una propiedad deseable en el mercado, ya que así mejoran los rendimientos al obtenerse mayor cantidad de manteca con menor volumen de grano procesado. La industria acepta como un cacao de buena calidad el que tiene un contenido de grasa igual o mayor al 55%, en base a peso seco y sin cascarilla (Kennedy et al., 1987; Lockwood & Yin, 1993). Respecto al contenido de ácidos grasos libres, la grasa procedente de granos sanos de buena calidad suele tener un contenido inferior al 1%; un contenido mayor es indicativo de granos que proceden de mazorcas enfermas, granos mal fermentados o con un secado demasiado lento, alto contenido de granos rotos, o almacenamiento en condiciones de alta humedad (Tagro Guehi et al., 2008).

El sabor es uno de los criterios más importantes a evaluar en un análisis de calidad de cacao. Un análisis sensorial incluye diversos atributos, entre los que se encuentran la

intensidad del sabor a chocolate, acidez residual, amargor y astringencia, y notas afrutadas o florales, y sabores no deseados como moho, humo, tierra y ácido. El panel sensorial también puede llegar a detectar sabores diversos debido a la presencia de fuentes contaminantes externas como los de copra (pulpa seca del coco), caucho, combustibles a base de aceite, sustancias químicas, pintura y cemento, entre otros (European Cocoa Association et al., 2015).

Araujo et al.(2014) clasificaron en tres grupos los mencionados parámetros de calidad así como otros más en función del interés industrial, de la influencia en el sabor y aroma, y del interés medicinal. Así, en función del interés industrial se incluyen los contenidos de grasa, fenoles totales, perfil fenólico (catequina y epicatequina). En función de la influencia en el sabor y aroma, incluyeron a los contenidos cafeína, teobromina, fenoles totales y azúcares. En función del interés medicinal, consideraron el perfil fenólico y los contenidos de teobromina y cafeína. En el mismo estudio, establecieron además los valores óptimos de cada parámetro. Así, por ejemplo, el pH óptimo del grano de cacao seco fue de 6,01 y el contenido óptimo de cafeína de 0,58 g/100g. Para los contenidos de grasa, fenoles totales, perfil fenólico y teobromina, propusieron solo los límites inferiores siendo en la grasa de 30,77 g/100g, en los fenoles totales de 46 mg/g, en la catequina de 0,08 mg/g, en la epicatequina de 2,22 mg/g, y en la teobromina de 0,25 mg/g.

En relación a los contenidos de proteína y azúcares totales, así como los perfiles de aminoácidos, diversos estudios realizados tanto en semillas como en granos de cacao han destacado su importancia en el desarrollo del sabor y aroma durante las etapas de fermentación, secado y tostado (Bertazzo, Agnolín, et al., 2011; Bertazzo, Comai, Brunato, Zancato, & Costa, 2011; Zak & Keeney, 1976) . No obstante, no se conocen fuentes normativas o estudios que establezcan unos valores óptimos, mínimos o máximos requeridos en la industria.

3.10. Compuestos bioactivos del grano de cacao

Los compuestos bioactivos son sustancias químicas que intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales. En las plantas, debido a su estructura química tan diversa, cumplen con diversas funciones como pigmentos, aromas, reguladores del crecimiento y reproducción, protectores naturales frente a parásitos. Aunque no son consideradas sustancias esenciales en humanos, ya que no se requieren para el metabolismo, a largo plazo son indispensables en la salud ya que intervienen ejerciendo un efecto protector del sistema cardiocirculatorio, reductor de la presión sanguínea, regulador de la glucemia y la colesterolemia, reductor del riesgo de

3. Introducción

cáncer y mejorador de la respuesta defensivo inmunitaria del cuerpo (Oracz, Zyzelewicz, & Nebesny, 2015).

Los granos de cacao son ricos en compuestos fenólicos dietéticos, poderosos antioxidantes naturales que contribuyen con alrededor del 10% del peso seco del grano entero (Rusconi & Conti, 2010). En estudios realizados con cacao comercial de diferentes orígenes, para determinar cuáles son los compuestos bioactivos potencialmente presentes, los componentes encontrados en los extractos son, además de los flavonoides como la epicatequina, catequina y el ácido cafeico, otros de igual importancia, como la teobromina y la cafeína, las cuales pertenecen al grupo de las metilxantinas (Belščak, Komes, Horžić, Ganić, & Karlović, 2009; Timbie, Sechrif, & Keeney, 1978). Tienen un papel importante en la contribución de las propiedades sensoriales de los granos de cacao y de los productos que de él se derivan, debido a que forman complejos con polisacáridos y proteínas (Niemenak, Rohsius, Elwers, Omokolo Ndoumou, & Lieberei, 2006). Además, estos compuestos en conjunto son los responsables de la capacidad antioxidante de los productos elaborados a base de cacao (Jalil & Ismail, 2008). En la Tabla 3 se muestra un resumen de los principales compuestos bioactivos encontrados en muestras de cacao no fermentado, ligeramente fermentado y fermentado, procedentes de diferentes países. Respecto a estudios realizados en México, Quiroz-Reyes et al., (2013) reportan la presencia de epicatequina y catequina, esta última en menor concentración, en una muestra de cacao comercial adquirida en el mercado local.

Tabla 3. Cuadro resumen de compuestos bioactivos identificados en granos de cacao de diferente origen.

Origen	Procesado	Compuesto	Concentración (mg/g de muestra seca)	Referencia
Sulawesi (Indonesia)	Ligeramente fermentado*	(-)-epicatequina	1,87 ± 0,32	Hurst et al., (2011)
		(+)- catequina	0,12 ± 0,01	
		(-)- catequina	0,10 ± 0,01	
Costa de marfil	Fermentado medio**	(-)-epicatequina	0,94 ± 0,22	
		(+)- catequina	0,08 ± 0,02	
		(-)- catequina	0,08 ± 0,00	
Papua, Nueva Guinea	Fermentado***	(-)-epicatequina	0,56 ± 0,02	
		(+)- catequina	0,07 ± 0,00	
		(-)- catequina	0,09 ± 0,02	
Ecuador	No fermentado	Fenoles totales	50,00	Schinella et al., (2010)
		(+)-catequina	1,20	
		(-)-epicatequina	0,67	
		Procianidina B1	0,11	
		Procianidina B2	0,17	
Bahía (Brasil)	Fermentado	Fenoles totales	25,78 ± 1,40	Leite, Maciel, Opretzka, Soares, & Bispo (2013)
		Ácido gálico	0,12 ± 0,00	
		(+)-Catequina	1,10 ± 0,02	
		Ácido cafeico	0,02 ± 0,02	
		(-)-Epicatequina	1,62 ± 0,03	
		Cafeína	trazas	
		Teobromina	0,01 ± 0,00	
Ghana	Fermentado	Fenoles totales	14,23 ± 0,80	Arlorio et al. (2008)
		Ácido protocatecoico	0,57	
		Ácido p-hidroxibenzoico	0,20	
		+ideaina		
		(+)- Catequina+ácidoclorogénico	0,16	

		(-)-Epicatequina	1,16	
		Cianidina	trazas	
		Quercetina	trazas	
		Kaempferol	0,02	
		Procianinida B1	0,42	
		Procianidina B2	0,02	
		Clovamida	trazas	
		Fenoles totales	135,92± 3,77	Quiroz-Reyes,
México	No se indica	(+)-Catequina	4,26 ± 0,025	Aguilar-Mendez,
		(-)-Epicatequina	144,00 ± 4,85	Ramírez-Ortiz, & Ronquillo-De Jesus(2013)

*Fermentado de dos días. ** Fermentado de cuatro días. *** Fermentado de seis días

3.10.1 Fenoles

Los fenoles constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosas y ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se trata de productos del metabolismo secundario de las plantas que se caracterizan por ser compuestos aromáticos que contienen en sus anillos de seis átomos de carbono el grupo hidroxilo como sustituyente (Wollgast & Anklam, 2000). Estos compuestos se almacenan en las células pigmentadas de los cotiledones, proporcionándoles a menudo un característico color amarillo, rojo o púrpura a las frutas y vegetales (Oracz et al., 2015). En el cacao, los fenoles suelen encontrarse en las células pigmentadas de los cotiledones formando enlaces complejos con polisacáridos y proteínas. Debido a esto tienen un papel importante en propiedades sensoriales como la astringencia y el amargor (Niemenak et al., 2006; Serra Bonvehi & Ventura Coll, 1997).

Los flavonoides constituyen el más grande y diverso grupo de compuestos fenólicos en cacao dentro de los cuales se puede distinguir la presencia de tres grupos: catequinas o flavan-3-ols, antocianinas y proantocianidinas. La principal catequina es la (-)-epicatequina que representa alrededor del 35% del contenido fenólico total. De acuerdo con la Tabla 2, en grano de cacao fermentado se le puede encontrar en rangos que varían entre 0,57 y 1,62 mg/g. También se pueden encontrar en más bajas cantidades o en cantidades traza, flavanoles como la (+)-catequina, (+)- galocatequina, (-)- y epigalocatequina. Dentro de las antocianinas pueden encontrarse la cianidina-3- α -L-arabinósido y la cianidina-3- β -D-galactósido. Los flavanol-glicósidos como la quercetina-3-O- α -D-arabinósido y la quercetina-3-O- β -D-glucopuranósido, también

3. Introducción

suelen encontrarse. Otros fenoles también presentes en cacao son la clovamida y la deoxiclovamida (Wollgast & Anklam, 2000). Los ácidos fenólicos que son frecuentes en cacao son los hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos y el ácido clorogénico (Oracz et al., 2015). Las estructuras básicas de la epicatequina y catequina, los principales fenoles del cacao, pueden verse en la Figura 7. Consisten en dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico que contiene un átomo de oxígeno (Oracz et al., 2015). Cabe señalar que los enantiómeros (-)-catequina y (+)-epicatequina no se encuentran comúnmente de forma natural (Hurst et al., 2011; Jalil & Ismail, 2008).

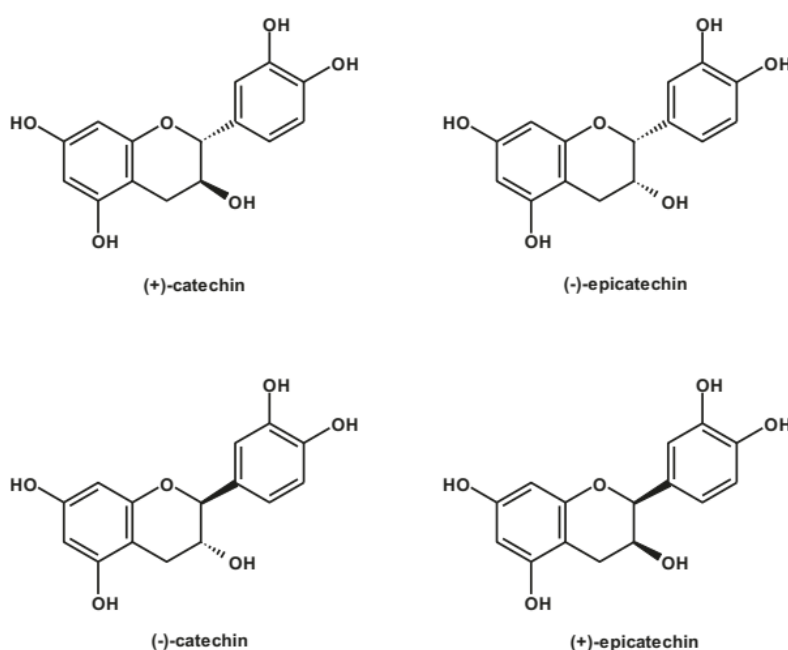


Figura 7. Estructuras de los compuestos fenólicos catequina y epicatequina (Hurst et al., 2011)

3.10.1.1. Propiedades de los fenoles

La atención sobre los compuestos fenólicos se ha incrementado debido a sus funciones fisiológicas, en las que se incluyen las antioxidantes, antimutagénicas y antitumorales (Othman, Ismail, Abdul Ghani, & Adenan, 2007). En cacao, numerosos estudios se han enfocado no solo a determinar su composición fenólica sino también su relación con la capacidad antioxidante y a su actividad anti-radicales libres, determinándose que compuestos como la epicatequina, catequina, quercetina,

3. Introducción

clovamida y procianidinas tienen una importante contribución debido a la naturaleza de su constitución y a la presencia de grupos hidroxilos (Gu, House, Wu, Ou, & Prior, 2006; Oracz & Nebesny, 2016; Osakabe et al., 1998; Sanbongi et al., 1998; Żyżelewicz et al., 2016). Entre otras importantes propiedades farmacológicas y biológicas que se atribuyen a los flavonoides en cacao, destacan la actividad antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antiviral y antibacteriana (Oracz et al., 2015).

Otros estudios enfocados en los flavanoles, compuestos clasificados dentro de los flavonoides, los han asociado también con numerosos beneficios para la salud debido a sus propiedades antioxidantes. Así, los contenidos en estos compuestos han sido relacionados con la estimulación de la oxidonitrosintasa, mejora del flujo sanguíneo, elasticidad arterial, reducción de la presión sanguínea y anti-agregante plaquetario, todas estas funciones fisiológicas relacionadas con la atenuación de enfermedades cardiovasculares (Corti, Flammer, Hollenberg, & Luscher, 2009) (Figura 8). Otros autores han demostrado la actividad antiinflamatoria y también la mitigación de las consecuencias negativas de una dieta alta en grasas (Żyżelewicz et al., 2016). Los flavonoides del cacao también han sido relacionados con efectos neuroprotectivos y sobre el desarrollo cognitivo, al actuar como protectores de las neuronas de daños inducidos por neurotoxinas, reduciendo la neuroinflamación y promoviendo la memoria, el aprendizaje y la función cognitiva (Nehlig, 2013).

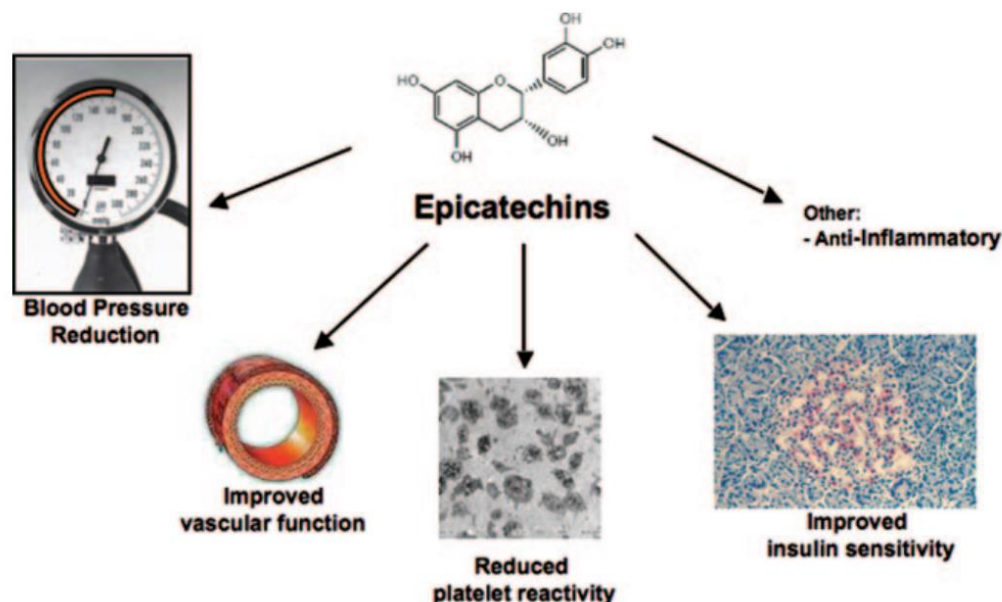


Figura 8. Efectos relevantes de la epicatequina sobre la salud (Corti et al., 2009).

3.10.2 Metilxantinas

Las xantinas son una variedad de compuestos pertenecientes a la familia de las purinas, las cuales son producidas por todas las células humanas. Se les puede encontrar de forma natural en plantas como el café, té, y cacao. En el cacao, los compuestos activos que son estructuralmente similares a las xantinas son las metilxantinas teobromina y cafeína, cuyas estructuras químicas se pueden ver en la Figura 9 (Franco, Oñatibia-Astibia, & Martínez-Pinilla, 2013). Junto a los flavonoides, las metilxantinas son los compuestos activos mayormente reconocidos en cacao. La teobromina predomina en los diferentes tipos de muestras analizadas hasta la fecha, oscilando en un rango de 7 a 15 mg/g de peso seco, mientras que la cafeína se encuentra en concentraciones que varían de 0,7 a 2 mg/g de peso seco (Carrillo, Londoño-Londoño, & Gil, 2014; Martínez-Pinilla, Oñatibia-Astibia, & Franco, 2015).

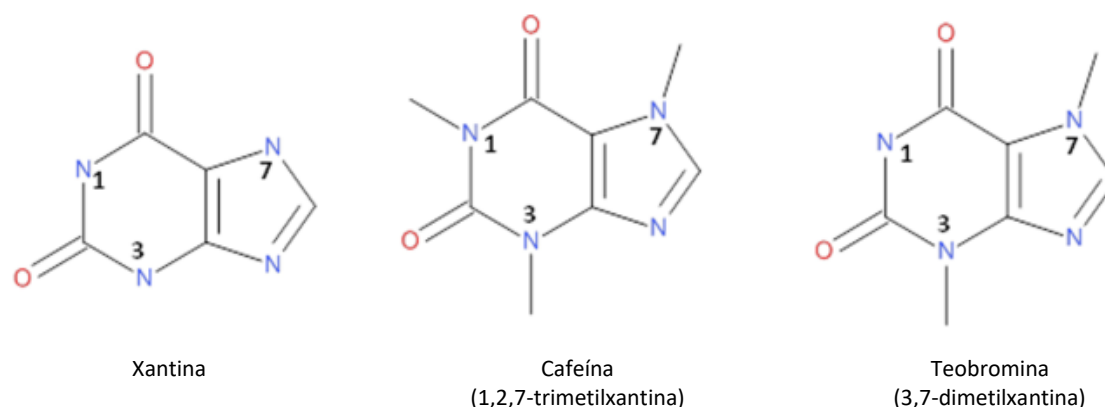


Figura 9. Estructura química de cafeína y teobromina (adaptado de Martínez-Pinilla et al., 2015).

3.10.2.1. Propiedades de las metilxantinas

Aunque las diversas propiedades sobre la salud que se atribuyen al cacao se relacionan frecuentemente con su contenido fenólico, hay evidencia creciente respecto al importante papel que tienen las metilxantinas, en especial la teobromina, en las propiedades saludables del cacao. Se sabe que las metilxantinas favorecen la excitación, el ánimo y los niveles de concentración al actuar sobre los receptores de adenosina en el sistema nervioso central (Nehlig, 2010). También tienen efectos sobre

el sistema cardiovascular y otras funciones metabólicas como la relajación bronquial y el incremento de la secreción de ácidos gástricos y de orina (Nehlig et al., 1992; Spiller, 1998). La teobromina, en particular, ha sido asociada, además, a la protección del esmalte de los dientes (Kargul et al., 2012). Se ha demostrado que también confiere protección cardiovascular y contribuye así a la reducción del riesgo de enfermedades coronarias, al aumentar significativamente los niveles de colesterol HDL en plasma y además disminuir los de LDL, (Khan et al., 2011; Neufingerl, Zebregs, Schuring, & Trautwein, 2013). Otros estudios sugieren que la teobromina y la cafeína pueden mejorar la función pulmonar y favorecer la broncodilatación en pacientes con asma (Simons, Becker, Simons, & Gillespie, 1985; Welsh, Bara, Barley, & Cates, 2010).

3.10.3. Factores que influyen en la composición de fenoles y metilxantinas del grano de cacao

El contenido fenólico del cacao se ve frecuentemente afectado por factores genéticos, la variedad, la región de producción y el procesamiento de los granos (Oracz et al., 2015). De acuerdo con Oracz & Nebesny (2016), el contenido de fenoles totales en cacao del tipo Criollo, es de aproximadamente dos tercios con respecto al cacao del tipo Forastero. En relación a la influencia del origen, diversos estudios realizados por Natsume et al. (2000), Osakabe et al. (1998) y Radojic Redovnikovic et al. (2009), encontraron diferencias significativas entre los contenidos de fenoles totales en muestras molidas de cotiledón de cacao del tipo Forastero procedentes de distintos países, que oscilaron entre 1,2 y 13 %. Así, en el cacao proveniente de Madagascar se registró el contenido más alto y en el de Colombia, el más bajo. En otro estudio realizado por Payne, Hurst, Miller, Rank, & Stuart (2010), se demostró la influencia del proceso de fermentación en la reducción del contenido de epicatequina y catequina. Esta reducción se notó sobre todo en la epicatequina cuyo contenido disminuyó desde 12 mg/g en los granos no fermentados a 1 mg/gen los fermentados. De acuerdo a otros estudios, los contenidos de epicatequina y los fenoles solubles suelen reducirse entre el 10 y 20 % durante esta etapa, lo cual sucede no solo por la oxidación sino también por la difusión con los exudados de la fermentación (Biehl, Passern, & Passern, 1977; Kim & Keeney, 1984). Cabe señalar que debido a la difusión con los exudados, la reducción tanto de los compuestos fenólicos como de las metilxantinas en el cotiledón durante la fermentación, corresponde al incremento de los mismos en la cascarilla del grano (Forsyth & Quesnel, 1957).

Aunque hay pocos estudios al respecto, al igual que los compuestos fenólicos, el contenido de metilxantinas en cacao puede estar influenciado por factores genéticos,

geográficos y de procesamiento (Brunetto et al., 2007; Carrillo et al., 2014). En el estudio realizado por Carrillo et al. (2014), en muestras de cacao no fermentado proveniente de diferentes regiones de Colombia, se encontraron diferencias significativas en el contenido de teobromina en los granos de los diferentes genotipos analizados, en un rango de 7,1 a 9,7 mg/g. También la cafeína presentó diferencias significativas en las mismas muestras en un rango de 0,7 a 1,9 mg/g. Estas diferencias se atribuyeron al factor genético debido a que las muestras analizadas incluían materiales tanto del tipo Forastero como Trinitario y Criollo. El estudio realizado por Brunetto et al. (2007) en muestras de cacao del Banco de germoplasma de Venezuela, también muestra diferencias en los contenidos de teobromina y cafeína según el tipo de cacao (Criollo, Trinitario o Forastero) y el nivel de fermentación. El rango para la teobromina fue de 5,0 a 12,0 mg/g y el de la cafeína de 1,0 a 4,0 mg/g. Con respecto al tiempo de fermentación se encontró que tanto la teobromina como la cafeína redujeron su contenido de forma proporcional conforme aumentaban los días expuestos a fermentación (desde uno a siete días). Es importante señalar que las determinaciones de los constituyentes mencionados en este apartado se han realizado en la mayoría de los estudios en muestras de cotiledón molido sin cascarilla.

3.11. Extracción de compuestos bioactivos en granos de cacao

De acuerdo con Stalikas (2007), para la recuperación y aislamiento de compuestos bioactivos en cualquier material vegetal, el primer paso en la preparación de la muestra es el molido y homogenizado de la misma. La extracción es la fase más importante y está influenciada por la naturaleza química del material, el método de extracción utilizado, el tamaño de partícula y la presencia de otros compuestos como ceras, grasas, terpenos y clorofilas. Las extracciones tipo líquido-líquido y sólido-líquido son las más comunes en los análisis de fenoles en vegetales.

La metodología empleada para la extracción depende del propósito de la investigación, el cual puede ser conocer el contenido de los mismos en un grupo de plantas, aislarlos de una planta de la cual es ya conocida su importancia, determinar la concentración de cierto flavonoide en una planta en particular o identificar un flavonoide aislado y purificado (Markham & Bloor, 1998). Cuando los compuestos fenólicos se encuentran formando complejos con glucósidos o ésteres, es beneficioso que la preparación de la muestra incluya una hidrólisis ácida o alcalina para romper los enlaces y separar los compuestos antes o después de la extracción con el solvente

3. Introducción

(Markham & Bloor, 1998; Grayer, 1989; Lee & Widmer, 1996; McMurrough & Byrne, 1992).

El desarrollo de un método de extracción eficiente para extraer compuestos bioactivos de cacao es un reto debido a la diversidad estructural de los mismos y, en el caso de fenoles, la formación de matrices complejas e interacción con otros compuestos. Además, es importante tomar en cuenta que la metodología debe ser rápida, de eficiente costo y ambientalmente adaptable (Plaza, Oliveira, Nilsson, & Turner, 2017).

Los métodos comunes de extracción de compuestos bioactivos en cacao deben incluir el desgrasado de la muestra antes de la extracción. En el cotiledón de cacao, los métodos de extracción más frecuentemente usados son las extracciones sólido-líquido a partir de una muestra sólida molida y desgrasada con los solventes metanol: agua 80:20 (v/v), etanol: agua 70:30 (v/v), agua 100 (v), etanol: agua 80:20 (v/v), entre otros. En estudios realizados con extractos de cacao obtenidos con agua en ebullición, se ha indicado fuerte actividad antioxidante y se sugiere que los compuestos antioxidantes más importantes extraídos fueron la epicatequina y la catequina (Osakabe et al., 1998). En otro estudio realizado a partir de extracto con etanol: agua 80:20 v/v de cacao desgrasado, se identificaron mediante espectrometría de masas, además de la catequina, otros cuatro compuestos, la clovamida, dideoxiclovamida, quercetin-3-glucósido y quercetin-3-arabinósido (Sanbongi et al., 1998). Leite, Maciel, Opretzka, Soares, & Bispo (2013) reportaron un contenido fenólico total de $25,78 \pm 1,40$ mg/g, $1618,74 \pm 31,30$ µg/g de epicatequina, $24,8 \pm 17,54$ µg/g de ácido cafeico, $1095,44 \pm 23,73$ de catequina y $124,26 \pm 6,88$ de ácido gálico, en un extracto fenólico a partir de metanol: agua 80:20 (v/v) de cotiledón desgrasado. En otro estudio realizado en cotiledón de cacao de Malasia, Ghana, Costa de Marfil y Sulawesi, se compararon dos métodos de extracción fenólica, recuperándose significativamente mayor cantidad de fenoles totales en un extracto de etanol al 70%, que en extracto acuoso en cacao, obteniéndose rangos de 0,8 a 0,11 mg/g (Othman et al., 2007). En el estudio comparativo para la extracción de fenoles realizado por Quiroz-Reyes, et al. (2013), aplicando radiación ultrasónica después de la maceración de la muestra con metanol: agua 50:50 (v/v) más acetona: agua 70:30 (v/v), fue posible recuperar mayor cantidad de fenoles totales y mejorar la actividad antioxidante tanto en muestras de cotiledón como en cascarilla de cacao.

La extracción sólido-líquido a alta presión es un método que usa el solvente a alta temperatura, generalmente por encima del punto de ebullición, lo cual hace el proceso de extracción más eficiente debido a mayor velocidad de difusión y por lo tanto

reducción del tiempo de extracción. El trabajo desarrollado por Plaza et al., (2017), permitió comparar la metodología a alta presión con agua caliente y una extracción convencional utilizando energía ultrasónica, en el cual la primera resultó ser más eficiente tanto por el contenido de fenoles como de metilxantinas extraídas del cotiledón tostado molido y sin desgrasar.

Todos los métodos descritos anteriormente se han llevado a cabo de forma analítica, sin haberse probado a nivel piloto ni a nivel industrial. Es importante mencionar, que aunque se dispone de información basta sobre las metodologías de extracción de compuestos bioactivos, hace falta profundizar y avanzar en el estudio de sistemas que por un lado los liberen o solubilizan y por otro permitan su extracción y purificación a nivel industrial, empleando tecnologías ya usadas para otros subproductos y que han permitido su comercialización gracias a los bajos costos de la materia prima y de los métodos de pre-tratamiento y de extracción.

3.12. La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS)

3.12.1 Fundamentos

La tecnología NIRS (acrónimo de las siglas en inglés de Espectroscopia en el Infrarrojo cercano, *Near Infrared Spectroscopy*) es un método de análisis ampliamente desarrollado, comercializado y utilizado a nivel industrial y de laboratorio. Entre las numerosas ventajas destacan la escasa o nula necesidad de preparar las muestras, su bajo costo y la rapidez del análisis, siendo fácil de ejecutar y reproducible. El análisis NIRS es, además, no destructivo (no se alteran las características del material analizado), no contaminante y posibilita la determinación de varias propiedades tanto cuantitativas como cualitativas en un misma muestra.

El principio en el que se basa esta tecnología es que cada uno de los constituyentes de mayor relevancia en una muestra presenta absorción infrarroja (Williams & Norris, 1987). Como se ve en la Figura 10, la región del infrarrojo cercano (NIR) comprende las longitudes de onda desde 780 a 2526 nm (Chavan, Bhargavi, Lodagekar, & Shastri, 2017). La radiación de infrarrojo cercano fue descubierta por Sir William Herschel en 1800, pero no empezó a aplicarse como técnica analítica hasta finales del siglo XIX, cuando Abney & Festing registraron el espectro de líquidos orgánicos en la región espectral comprendida entre 700 y 1200 nm. A mediados del s XX se desarrollaron las primeras aplicaciones analíticas de esta técnica, con la determinación de la humedad, fibra, proteína y grasa en productos agrícolas, fundamentalmente

3. Introducción

cereales, y desde ese momento, el interés del NIR como técnica analítica ha ido en aumento.

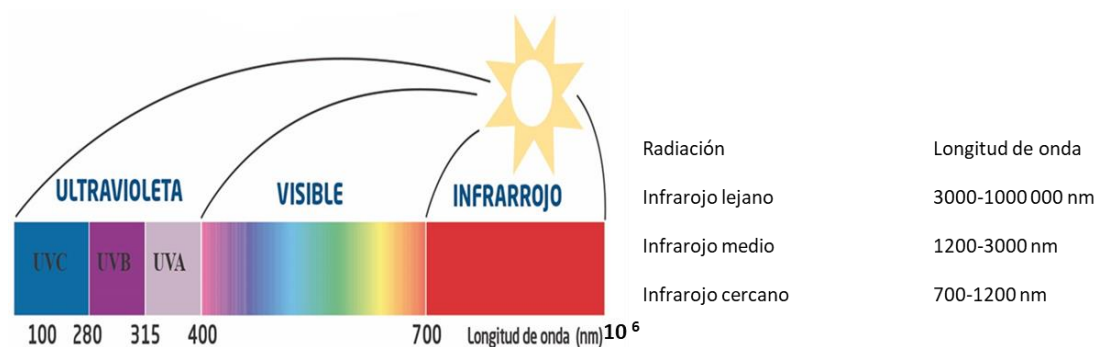


Figura 10. Rangos del espectro de luz ultravioleta, visible e infrarroja.

La espectroscopia NIR está fundamentalmente orientada a la determinación y cuantificación de compuestos orgánicos, los cuales se caracterizan por la presencia de grupos funcionales como -OH, -NH, -CO y -CH en las muestras que se analizan. Los enlaces presentes en estos grupos sufren una serie de vibraciones y proporcionan bandas características de absorción a determinadas longitudes de onda cuando un compuesto orgánico es irradiado con energía infrarroja. La energía absorbida se representa en forma de espectros que son la reproducción gráfica de este patrón de absorción (Nicolai et al., 2007).

Hay cuatro modalidades para la obtención de espectros NIR de una muestra: transmitancia, reflectancia, transflectancia e interactancia, los cuales se ilustran en la Figura 11. La elección de uno u otro método depende frecuentemente del tipo de muestra analizada. Para las muestras sólidas, molidas y relativamente pequeñas, suele usarse la reflectancia debido a la fuerte dispersión. Cuando la muestra es irradiada por el haz de luz se produce una reflectancia difusa que penetra la capa superficial, excita las moléculas y luego se dispersa en todas las direcciones, produciendo un espectro de reflectancia que depende de la composición y densidad óptica de la muestra. Para las muestras líquidas, los métodos de medición usados son la transmitancia y transflectancia; y para las muestras con partículas grandes relativamente grandes y/o intactas los métodos de interactancia y transmitancia son los más idóneos (Alander, Bochko, Martinkauppi, Saranwong, & Mantere, 2013).

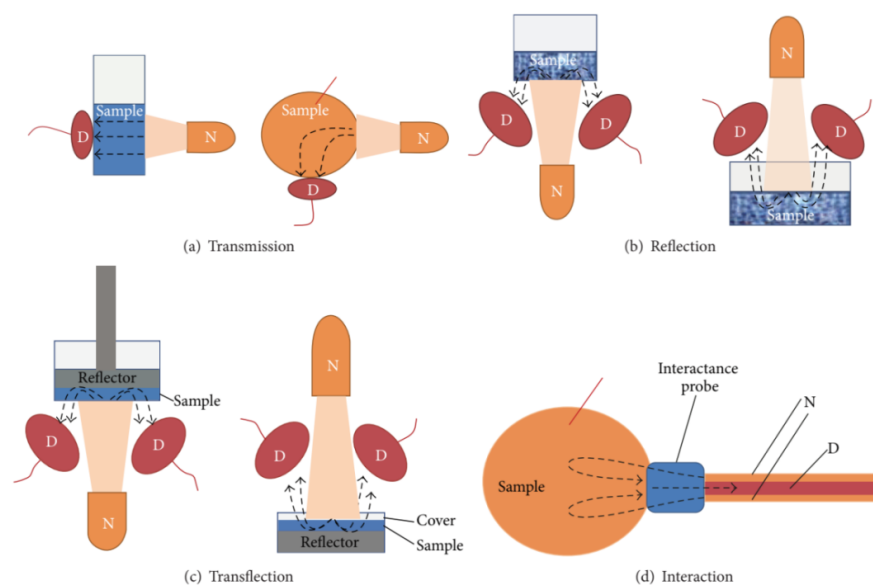


Figura 11. Presentación de muestras para lectura en espectroscopía de Infrarojo Cercano (NIR). N: Fuente de luz NIR, D: Detector. (Alander et al., 2013).

Para llevar a cabo los análisis cuantitativos, es necesario tener un conjunto de espectros con sus respectivos datos de laboratorio y relacionarlos mediante tratamientos matemáticos y estadísticos para crear una ecuación de calibración. En general, las etapas básicas en la aplicación de la técnica NIR incluyen la adquisición y almacenamiento de espectros, el desarrollo de calibraciones mediante métodos de regresión y la validación posterior, y finalmente el desarrollo de los modelos de calibración para el análisis de rutina. La selección de un pre-procesamiento adecuado de los espectros es un paso importante en el desarrollo de modelos de calibración. Por otro lado, en relación a los análisis de rutina, debe considerarse la influencia de factores como el estado del instrumento, factores ambientales como la temperatura y la humedad, condiciones físicas del espacio donde se lleva a cabo la medición y la transferibilidad de las ecuaciones desarrolladas entre varios instrumentos en el mismo periodo de tiempo o hacia instrumentos más recientes (Alander et al., 2013).

Sin duda, como se ha comentado anteriormente, una importante ventaja del NIR es que permite hacer calibraciones para muchos productos y componentes, siempre que se disponga de análisis físico-químicos de referencia precisos y confiables. La introducción de las herramientas quimiométricas y la modernización de softwares para el procesamiento de datos, han contribuido al incremento de su uso por la industria en las últimas décadas (Chavan et al., 2017).

3.12.2. Aplicaciones

La tecnología NIRS se está aplicando en sectores muy diversos relacionados con el medio ambiente, farmacia, cosmética, biología, medicina, industrias químicas, petroquímicas, textiles y más recientemente en la industria agroalimentaria. En relación a esta última, son numerosas las aplicaciones para evaluar la composición de un alimento (tanto para alimentación humana como animal), el procesamiento y la certificación de su calidad, utilizándose para ello diversos tipos de muestras, como líquidas y sólidas, molidas e intactas (Alander et al., 2013; Chavan et al., 2017; Jha & Matsuoka, 2000). De hecho, en muchos laboratorios e industrias la tecnología NIRS se emplea de forma rutinaria en la determinación de parámetros de calidad, como por ejemplo la dureza, vitrosidad, color, humedad, proteína, grasa, almidón, celulosa contenido de carotenoides en granos y aceites de semilla (Kim, Singh, & Kays, 2006). También son diversos los estudios que demuestran la aplicación de esta técnica para el análisis a nivel cualitativo. Así, por ejemplo la tecnología NIRS permite detectar la presencia de cuerpos extraños, microorganismos, y compuestos contaminantes o falsos ingredientes en un producto, así como evaluar atributos relacionados con la calidad sensorial como apariencia, sabor y olor (Alander et al., 2013; Davies ' et al., 1991; Nicolaï et al., 2007). En frutos y vegetales se aplica el NIR en muestras para la determinación no destructiva de sólidos solubles totales, textura, materia seca, acidez o desordenes internos (Nicolaï et al., 2007).

En relación a la determinación de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante, una interesante revisión realizada por Cozzolino, (2015) demuestra el potencial del NIRS, siendo muy diversos los estudios que se han llevado a cabo en años recientes en diversos alimentos como el vino, lácteos, té, frutos, vegetales, hierbas, especias y cereales utilizando métodos predictivos como los de regresión de componentes principales (PCR), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) y regresión lineal múltiple.

La tecnología NIRS también se está aplicando en el análisis de residuos agroindustriales, ya que la predicción rápida y simultánea de los contenidos de diversos compuestos también contribuye a su revalorización. Así, en un estudio llevado a cabo sobre residuos de la industria del olivo, como los huesos de las aceitunas, ramas y brotes de los árboles y el orujillo procedente de diferentes compañías energéticas, se obtuvieron buenas predicciones en los parámetros de humedad, contenido de cenizas, materia volátil, valor calorífico bruto, valor calorífico neto, carbono, hidrógeno y nitrógeno totales (Mata Sánchez et al., 2015). Otro estudio,

realizado por Rambo, Alves, Garcia, & Ferreira (2015), propone la aplicación del NIR en las biorefinerías para la determinación fácil y económica del contenido de monosacáridos totales, polisacáridos totales y azúcares totales. El NIR también se ha propuesto para el análisis de residuos de café molido (después de ser utilizado), los cuales constituyen una fuente rica en compuestos bioactivos como el ácido clorogénico y flavonoides, reconocidos por su fuerte poder antioxidante (Páscoa, Magalhães, & Lopes (2013).

3.12.3 Aplicación del NIRS en el análisis de la calidad del grano de cacao

En la Tabla 4 se muestra un resumen de los estudios basados en el potencial de la tecnología NIRS para el análisis de la calidad del grano de cacao. Estos se han centrado fundamentalmente en el uso de cotiledón, no habiéndose encontrado en la literatura constancia alguna de la aplicación del NIRS para la determinación de la calidad de la cascarilla.

En 1991, el estudio de Davies ' et al. demostró la viabilidad del NIRS para la predicción de la calidad sensorial de chocolate y el grado de fermentación a partir de 144 muestras de grano crudo, grano tostado, pasta de cacao y chocolate terminado, utilizando diferentes análisis quimiométricos para el procesamiento de datos. Posteriormente, Whitacre et al. (2003), analizaron el contenido de procianidinas mediante el escaneo de muestras líquidas de cacao a 50°C. La mayoría de trabajos son sin embargo más recientes ya que se han realizado en los últimos cinco años, y muestran el potencial del NIRS para la predicción de parámetros como el contenido de grasa, pH, índice de fermentación, fenoles totales, fenoles individuales como la epicatequina, así como las metilxantinas teobromina y cafeína (Hashimoto et al., 2018; X. Huang et al., 2014; Krämer et al., 2015; 2016; Teye & Huang, 2015; Teye, Huang, Han, & Botchway, 2014; Teye, Huang, Takrama, & Haiyang, 2014), así como para el análisis cualitativo de los granos según su grado de fermentación (Kutsanedzie, Chen, Sun, & Cheng, 2017; Teye, Huang, Lei, & Dai, 2014), o la clasificación según su origen y prácticas de pre y poscosecha (Teye, Huang, Dai, & Chen, 2013). Estos trabajos se han hecho fundamentalmente en muestras de cotiledones molidos, con diferentes grados de fermentación, y en algunos casos fusionando la tecnología NIRS con otras como la lengua electrónica o bien empleando la técnica de la transformada de Fourier (FT-NIR). La transformada de Fourier (FT) es una función matemática de aplicación lineal empleada para transformar señales entre el dominio del tiempo y el dominio de la frecuencia creando finalmente un espectro de frecuencias (Jou, Llebot & Pérez-García, 1994).

3. Introducción

En relación al uso del NIR para el análisis de parámetros a partir de espectros de grano intacto solo se conoce el trabajo de Sunoj et al. (2016), en el que determinaron, en un total de 72 muestras, el índice de fermentación, el pH y los fenoles totales, teniendo en cuenta la influencia del tiempo de almacenamiento de la mazorca y los días de fermentación. En el estudio se utilizó el FT-NIRS, escaneando las muestras en la región espectral de 800 a 2778 nm y las calibraciones se realizaron utilizando el método de regresión del cuadrado parcial medio. Con respecto al estudio de compuestos bioactivos individuales en grano intacto en la actualidad no se conocen trabajos realizados. De confirmarse el potencial, la tecnología NIRS se convertiría en una herramienta muy interesante para la clasificación rápida de genotipos en los bancos de germoplasma y en programas de mejora, como se ha demostrado para otros frutos (dos Santos Neto, de Assis, Casagrande, Cunha Júnior, & de Almeida Teixeira, 2017; Y. Huang, Lu, & Chen, 2018; Morales-Sillero et al., 2011; Sánchez et al., 2017; Uwadaira, Sekiyama, & Ikehata, 2018).

Tabla 4. Estudios realizados sobre el uso de la tecnología NIRS para el análisis de diversos parámetros de calidad en cacao (cotiledón)

Variedad (Tipo)	Procesado	Tipo muestra	Tamaño muestra (N)	Tipo de análisis	Parámetros estudiados	Referencia
Forastero	Diferentes grados de fermentación, tostado y procesado.	Muestras molidas de cotiledón seco, grano tostado, pasta de cacao, chocolate terminado	144	NIRS	Atributos sensoriales de sabor (6) y aroma (23) Grado de fermentación	Davies et al.(1991)
Forastero	Diferentes grados de fermentación y tostado	Muestras en estado líquido (50°C)de cotiledón seco y tostado	96	NIRS	Procianidinas	Whitacre et al. (2003)
Forastero	Diferentes grados de fermentación	Muestras molidas de cotiledón seco	130	FT-NIRS	pH, índice de fermentación	Teye et al. (2015)
Trinitario	Diferentes grados de fermentación	Muestras molidas de cotiledón seco (<1mm)	48	NIRS	pH, grado de fermentación, humedad, grasa, nitrógeno, ácido acético, ácido láctico, carbohidratos, aminoácidos libres, fenoles totales , metilxantinas, cafeína, teobromina,	Krähmer et al. (2015)
Forastero	Diferentes grados de fermentación	Granos de cacao enteros secos	72	FT-NIRS	pH, Índice de fermentación, fenoles totales	Sunoj et al. (2016)
Forastero	Diferentes grados de fermentación	Muestras molidas de cotiledón seco (400 µm)	90	NIRS	Grado de fermentación	Kutsanedzie, Chen, Sun, & Cheng (2017)
No se indica	Fermentado	Muestras molidas de cotiledón seco (0.5 mm)	193	NIRS	Epicatequina, proantocianidina B1, proantocianidina B2, flavan-3-ols	Hue et al.(2014)
No se indica	Fermentado	Muestras molidas de cotiledón seco (0.5 mm)	190	NIRS	NH ₃	Hue et al.(2014)
Híbridos de forastero	Fermentado	Muestras molidas de	100	NIRS y lengua electrónica	pH, humedad proteína, ceniza	Teye, Huang, Takrama, &

3. Introducción

Forastero	Fermentado	cotiledón seco (500 μ m) Grano de cacao seco completo molido (0.21-0.35mm), cotiledón de grano seco molido (0.21-0.35mm).	81	NIRS		pH, humedad, acidez, grasa, proteína, contenido de cascarilla, fenoles totales, teobromina y cafeína	Haiyang (2014) Hashimoto et al.(2018)
Forastero	No se indica	Muestras molidas de cotiledón seco (500 μ m)	110	NIRS y lengua electrónica		Fenoles totales	Huang et al.(2014)
Forastero	No se indica	Muestras molidas de cotiledón seco (500 μ m)	80	FT-NIRS		Grasa	Teye & Huang (2015)

4. Bibliografía

4. Bibliografía

- Actualix.com (2018). <https://es.actualitix.com/pais/mex/mexico-grano-de-cacao-produccion.php>. Consultada en septiembre de 2018.
- Afoakwa O.E. (2010). *Chocolate Science and Technology*. Singapore. Wiley-Blackwell Ed. ISBN 978-1-4051-9906-3. 259P.
- Afoakwa O.E., Quao J., Takrama J., Budu A. & Saalia F. (2011). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food and Science Technology* 50(6):1097-1105.
- Alander, J. T., Bochko, V., Martinkauppi, B., Saranwong, S., & Mantere, T. (2013). A Review of Optical Nondestructive Visual and Near-Infrared Methods for Food Quality and Safety. *International Journal of Spectroscopy*, 2013, 1–36. doi.org/10.1155/2013/341402
- Álvarez, C., Pérez, E., Cros, E., Lares, M., Assemat, S., Boulanger, R., & Davrieux, F. (2012). The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and (-)-epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of Criollo cocoa. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20(2), 307–315.
- Araujo, Q. R., Fernandes, C. A. F., Ribeiro, D. O., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R., ... Araujo, T. G. (2014). Cocoa Quality Index - A proposal. *Food Control*, 46, 49–54. doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003
- Arlorio, M., Coïsson, J. D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*, 38 (89), 1009-1014. doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.012
- Arlorio, M., Locatelli, M., Travaglia, F., Coïsson, J. D., Grosso, E. Del, Minassi, A., ... Martelli, A. (2008). Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 106(3), 967–975. doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.009
- Avendaño-Arrázate, C.H., Villarreal-Fuentes, J.M., Campos-Rojas E., Gallardo-Méndez, R.A., Mendoza-López, A., Aguirre-Medina, J.F., Sandoval-Esquivel A., Espinoza-Zaragoza, S. (2011). *Diagnóstico del cacao en México*. Universidad Autónoma Chapingo. México. ISBN 978-607-12-0219-2.

5. Bibliografía

- Azpeitia-Morales, A., Gasca-González, H.A. & Villordo-Pineda, E. (2017). Relaciones de parentesco en híbridos F1 de cacao (*Theobroma cacao* L.) por marcadores moleculares. *Acta Universitaria*, 27(6), 66-78. doi: 10.15174/au.2017.1552
- Baah, F., & Anchirinah, V. (2011). American Journal of Social and Management Sciences. *Journal of Social and Management Sciences*, 2(1), 196–201. doi.org/10.5251/ajsms.2011.2.1.196.201
- Badrie, N., Bekele, F., Sikora, E., & Sikora, M. (2015). Cocoa Agronomy, Quality, Nutritional, and Health Aspects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(5), 620–659. doi.org/10.1080/10408398.2012.669428
- Barel, M. (1997). La fermentation du cacao : le moyen de l'apprecier et de la maitriser. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 114(4).
- Barrón García, Y. P., Morales, A. A., Andrade, A. L., Mirafuentes-Hernández, F., Paulina, Y., & García, B. (2014). Metodología adaptada para la formación de híbridos F1 de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tabasco* Methodology adapted to the formation of F1 hybrids of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Tabasco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Mex. Cienc. Agríc*, 5(5).
- Biscuit, Cake, Chocolate and Confectionery Alliance (BCCCA) (1996). Cocoa beans. Chocolate Manufacturers Quality Requirements. 4th edn. p. 10. London, UK.
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa - A review. doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007
- Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., & Karlović, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42(5–6), 707–716. doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.018
- Bertazzo, A., Agnolin, F., Comai, S., Zancato, M., Costa, C. V. L., Seraglia, R., & Traldi, P. (2011). The protein profile of *Theobroma cacao* L. seeds as obtained by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(14), 2035–2042. doi.org/10.1002/rcm.5080
- Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M., & Costa, C. V. L. (2011). The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans. *Food Chemistry*, 124(1), 93–96. doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.110

5. Bibliografía

- Biehl, B., Passern, U., & Passern, D. (1977). Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(1), 41–52. doi.org/10.1002/jsfa.2740280107
- Brunetto, M. del R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, Á., ... Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100(2), 459–467. doi.org/10.1016/J.foodchem.2005.10.007
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273–280. doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.019
- Chavan, R. B., Bhargavi, N., Lodagekar, A., & Shastri, N. R. (2017). Near infra red spectroscopy: a tool for solid state characterization. *Drug Discovery Today*, 22(12), 1835–1843. doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.002
- Cheok, C. Y., Mohd Adzahan, N., Abdul Rahman, R., Zainal Abedin, N. H., Hussain, N., Sulaiman, R., & Chong, G. H. (2016). Current trends of tropical fruit waste utilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–27. doi.org/10.1080/10408398.2016.1176009
- Cheesman E. E. (1944). Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 21:144–159.
- Coe, S. D., & Coe, M. D. (1996). *The true history of chocolate*. Thames and Hudson.
- Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., & Luscher, T. F. (2009). Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation*, 119(10), 1433–1441. doi.org/10.1161/circulationha.108.827022
- Cozzolino, D. (2015). Infrared Spectroscopy as a Versatile Analytical Tool for the Quantitative Determination of Antioxidants in Agricultural Products, Foods and Plants. *Antioxidants*, 4(3), 482–497. doi.org/10.3390/antiox4030482
- Cuatrecasas, J. (1964). *Cacao and Its Allies, a Taxonomic Revision of the Genus Theobroma*.
- Davies ', A. M. C., Franklin, J. G., Grant, A., Griffiths, N. M., Shepherd, R., & Fenwick,

5. Bibliografía

- G. R. (1991). Prediction of chocolate quality from near-infrared spectroscopic measurements of the raw cocoa beans. *Vibrational Spectroscopy*, 2, 161–172.
- Dos Santos Neto, J. P., de Assis, M. W. D., Casagrande, I. P., Cunha Júnior, L. C., & de Almeida Teixeira, G. H. (2017). Determination of 'Palmer' mango maturity indices using portable near infrared (VIS-NIR) spectrometer. *Postharvest Biology and Technology*, 130 (December 2016), 75–80. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.03.009
- Encina, C. L., López Granero, M., Regalado, J. J., Arana, A., Carmona, E., & Grícola, M. (2018). *Agrícola Vergel Abril 2018*. El cacao (*Theobroma cacao* L.): Familia, especies, variedades y colecciones de germoplasma.
- Eskes, A.B. and Lanaud, C. (2001). Cocoa. In: Tropical Plant Breeding, pp. 78–105, Charrier, A., Jacquot, M., Hamon, S., Nicolas, D., Eds., Science Publishers Inc.: Plymouth & CIRAD, Montpellier. Translation editor Razdan, M. K.
- European Cocoa Association, CAOBISCO, & Federation of Cocoa Commerce. (2015). *Cacao en Grano: Requisitos de Calidad de la Industria del Chocolate y el Cacao*. doi.org/ISBN: 978-2-9601817-2-2
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Department (FAOSTAT), 2018.
- Forsyth, W. G. C., & Quesnel, V. C. (1957). Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8, 505–509.
- Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., & Martínez-Pinilla, E. (2013). Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients*, 5(10), 4159–4173. doi.org/10.3390/nu5104159
- Grayer, R. J. (1989). Flavanoids. In J. B. Harborne, Plant phenolics (Vol. 1) (pp. 283–323). San Diego: Academic Press Inc.
- Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., & Prior, R. L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4057–4061. doi.org/10.1021/jf060360r
- Hardy, F. 1961. Manual de cacao. IICA. Turrialba, Costa Rica. 439 p.
- Hashim, P., Selamat, J., Syed Muhammad, S. K., & Ali, A. (1998). Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(4),

543-550.

- Hashimoto, J. C., Lima, J. C., Celeghini, R. M. S., Nogueira, A. B., Efraim, P., Poppi, R. J., & Pallone, J. A. L. (2018). Quality Control of Commercial Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) by Near-infrared Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 11(5), 1510–1517. doi.org/10.1007/s12161-017-1137-2
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P. A., Ramírez-Guillermo, M. A., Guerra Ramírez, D., & Caballero Pérez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 690–695. doi.org/10.1002/fsn3.333
- Hii, C. L., Law, C. L., & Cloke, M. (2009). Modeling using a new thin layer drying model and product quality of cocoa. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 191–198. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.022
- Huang, X., Teye, E., Sam-Amoah, L. K., Han, F., Yao, L., & Tchabo, W. (2014). Rapid measurement of total polyphenols content in cocoa beans by data fusion of NIR spectroscopy and electronic tongue. *Analytical Methods*, 6(14), 5008–5015. doi.org/10.1039/c4ay00223g
- Huang, Y., Lu, R., & Chen, K. (2018). Prediction of firmness parameters of tomatoes by portable visible and near-infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 222, 185–198. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.030
- Hue, C., Gunata, Z., Bergounhou, A., Assemat, S., Boulanger, R., Sauvage, F. X., & Davrieux, F. (2014). Near infrared spectroscopy as a new tool to determine cocoa fermentation levels through ammonia nitrogen quantification. *Food Chemistry*, 148, 240–245. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.005
- Hurst, W. J., Krake, S. H., Bergmeier, S. C., Payne, M. J., Miller, K. B., & Stuart, D. A. (2011). Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 53. doi.org/10.1186/1752-153X-5-53
- International Cocoa Organization (ICCO). Pagina web: <https://icco.org/>
- International Organization for Standardization (ISO 2014). Cocoa beans - Specification (ISO 2451). Ginebra: Organización Internacional de Normalización.
- Jalil, A. M. M., & Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13(9), 2190–2219.

doi.org/10.3390/molecules13092190

- Jha, S. N., & Matsuoka, T. (2000). Non-Destructive Techniques for Quality Evaluation of Intact Fruits and Vegetables. *Food Science and Technology Research*, 6(4), 248–251. doi.org/10.3136/fstr.6.248
- Jou, D., Llebot, J.E., Pérez-García, C. (1994). Física para ciencias de la vida. Mc.Graw-Hill/Interamericana de España, S.A. España.
- Kargul, B., Özcan, M., Peker, S., Nakamoto, T., Simmons, W. B., & Falster, A. U. (2012). Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: a pilot study. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 10(3), 275–282.
- Kennedy AJ, Lockwood G, Mossu G, Simmonds NW and Tan GY (1987) Cocoa breeding: past, present and future. *Cocoa Growers' Bulletin* 38: 5–22.
- Khan, N., Monagas, M., Andres-Lacueva, C., Casas, R., Urpí-Sardà, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2011). Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. doi.org/10.1016/j.numecd.2011.02.001
- Kim, Y., Singh, M. & Kays, S.E. (2006). “Near-infrared spectroscopy for measurement of total dietary fiber in homogenized meals,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 2, pp. 292–298.
- Krähmer, A., Engel, A., Kadow, D., Ali, N., Umaharan, P., Kroh, L. W., & Schulz, H. (2015). Fast and neat - Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 181, 152–159. doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.084
- Kutsanedzie, F. Y. H., Chen, Q., Sun, H., & Cheng, W. (n.d.). In situ cocoa beans quality grading by near-infrared-chemodyes systems. doi.org/10.1039/c7ay01751k
- Lagunes-Gálvez, S.G., 2002. Isolement et caractérisation de bactéries acétiques provenant de la fermentation du cacao. DEA. Ecole Doctorale Science et Procédé et Biologiques et Industriels. Université de Montpellier II, Montpellier. 34 pp.
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124–130.

doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041

- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, *104*(3), 948–954. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.054
- Lee, H. S., & Widmer, B. W. (1996). Phenolic compounds. In L. M. L. Nollet, *Handbook of food analysis* (Vol. 1) (pp. 821–894). Basel, New York, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.
- Leite, P. B., Maciel, L. F., Opretzka, L. C. F., Soares, S. E., & Bispo, E. D. (2013). Phenolic Compounds, Methylxanthines and Antioxidant Activity in Cocoa Mass and Chocolates Produced from “Witch Broom Disease” Resistant and Non Resistant Cocoa Cultivars. *Ciencia E Agrotecnologia*, *37*(3), 244–250. doi.org/10.1590/S1413-70542013000300007
- Lockwood, G. and Yin, J.P.T. (1993). Utilization of cocoa germplasm in breeding for yield. In: *Proceedings of International Workshop on Conservation, Characterisation and Utilisation of Cocoa Genetic Resources in the 21st Century*, Port of Spain, Trinidad, September 13–17, 1992, Port of Spain, Trinidad: The Cocoa Research Unit, pp. 198–214.
- López-Andrade, P.A.; Ramírez-Guillermo, M.A. & Hernández-Hernández, C. (2013). *Propagación y manejo de plantaciones de clones de cacao en Tabasco*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México.
- López-Baez, O. (1995). Características del fruto del germoplasma de cacao, *Theobroma cacao* L., seleccionado en Rosario Izapa, Chiapas. *Agricultura Técnica de México* *21*(2): 127-137.
- Markham, K. R., & Bloor, S. J. (1998). *Analysis and identification of flavonoids in practice*. Marcel Dekker. 33 p.
- Martínez-Pinilla, E., Oñatibia-Astibia, A., & Franco, R. (2015). The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology*, *6*(FEB), 1–5. doi.org/10.3389/fphar.2015.00030
- Mata Sánchez, J., Pérez Jiménez, J. A., Díaz Villanueva, M. J., Serrano, A., Núñez, N., & López Giménez, J. (2015). Assessment of near infrared spectroscopy for energetic characterization of olive byproducts. *Renewable Energy*, *74*, 599–605.

doi.org/10.1016/j.renene.2014.08.066

- McMurrough, I., & Byrne, J. R. (1992). HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds, and various compounds of alcoholic beverages. In L. M. L. Nollet, *Food analysis by HPLC* (pp. 579–641). New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc.
- Morales-Sillero, A., Fernández-Cabanás, V. M., Casanova, L., Jiménez, M. R., Suárez, M. P., & Rallo, P. (2011). Feasibility of NIR spectroscopy for non-destructive characterization of table olive traits. *Journal of Food Engineering*, *107*(1), 99–106. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.039
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(3), 897–903. doi.org/10.1007/s11947-010-0363-z
- Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T. and Yoshida, T. (2000). Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci. Biotech. Bioch.* *64*:2581–2587
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, *24*(1), 87–94. doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013
- Nehlig, A., Daval, J. and Debry, G. (1992) Caffeine and the central nervous system: Mechanism for action, biochemical, metabolic, and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, *17*: 139-170.
- Nehlig, A. (2010). Is Caffeine a Cognitive Enhancer? *Journal of Alzheimer's Disease*, *20*(s1), S85–S94. doi.org/10.3233/JAD-2010-091315
- Nehlig, A. (2013). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*(3), 716–727. doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04378.x
- Neufingerl, N., Zebregs, Y. E., Schuring, E. A., & Trautwein, E. A. (2013). Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *97*(6), 1201–1209. doi.org/10.3945/ajcn.112.047373

5. Bibliografía

- Nicolaï, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 46(2), 99–118. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo Ndoumou, D., & Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 612–619. doi.org/10.1016/j.jfca.2005.02.006
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2014). Cocoa and Coffee Fermentations. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 485–492). CRC Press. doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00074-4
- Ocampo-Brondo, E.G., Ríos-Barba, J.I., Soria-Luna Z.B. (2012). Investigación del cacao en México. FCA UNAM.
- Okino Delgado, C. H., & Fleuri, L. F. (2016). Orange and mango by-products: Agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description. A review. *Food Reviews International*, 32(1), 1–14. doi.org/10.1080/87559129.2015.1041183
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., & Rodrigues, C. E. C. (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 103–112. doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007
- Oracz, J., & Nebesny, E. (2016). Antioxidant Properties of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.): Influence of Cultivar and Roasting Conditions. *International Journal of Food Properties*, 19(6), 1242–1258. doi.org/10.1080/10942912.2015.1071840
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., & Nebesny, E. (2015). The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(9), 1176–1192. doi.org/10.1080/10408398.2012.686934
- Osakabe, N., Yamagishi, M., Sanbongi, C., Natsume, M., Takizawa¹, T., & Osawa², T. (1998). The Antioxidative Substances in Cacao Liquor. *J Nutr Sci Vitaminol*, 44, 313–321.
- Othman, A., Ismail, A., Abdul Ghani, N., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530.

doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.021

- Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., ... Pavlović, N. (2018). Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules*, 23(6), 1–14. doi.org/10.3390/molecules23061404
- Páscoa, R. N. M. J., Magalhães, L. M., & Lopes, J. A. (2013). FT-NIR spectroscopy as a tool for valorization of spent coffee grounds: Application to assessment of antioxidant properties. *Food Research International*, 51(2), 579–586. doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.01.035
- Payne, M. J., Hurst, W. J., Miller, K. B., Rank, C., & Stuart, D. A. (2010). Impact of fermentation, drying, roasting, and dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10518–10527. https://doi.org/10.1021/jf102391q
- Phillips-Mora, W., Arciniegas-Leal, A., Mata-Quirós, A., & Motamayor-Arias, J. (2012). Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. *Serie técnica - Manual técnica 105*.
- Plaza, M., Oliveira, D., Nilsson, A., & Turner, C. (2017). Green and Efficient Extraction Method to Determine Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products. *Food Analytical Methods*, 10(8), 2677–2691. doi.org/10.1007/s12161-017-0830-5
- Presilla, M. E. (2001). The new taste of chocolate: a cultural and natural history of cacao with recipes. pp., 198 Ten Speed Press: California, U.S.A.
- Purseglove, J. W. (1988). *Tropical Crops: Dicotyledons*; Longman: Singapore.
- Quiroz-Reyes, C. N., Aguilar-Mendez, M. a., Ramírez-Ortíz, M. E., & Ronquillo-De Jesus, E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 11–18.
- Radojic Redovnikovic, I., Delonga, K., Mazor, S., Dragovic-Uzelac, V., Caric, M. and Vorkapic-Furac, J. (2009). Polyphenolic content and composition and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech J. Food Sci.* 27:330–337.
- Rambo, M. K. D., Alves, A. R., Garcia, W. T., & Ferreira, M. M. C. (2015). Multivariate analysis of coconut residues by near infrared spectroscopy. *Talanta*, 138, 263–272. doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.014

5. Bibliografía

- Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., & Fernández-Bolaños, J. (2013). Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: Characterization and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *54*(1), 114–124. doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.011
- Rusconi, M., & Conti, A. (2010). Theobroma cacao L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, *61*(1), 5–13. doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.008
- Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., & Osawa, T. (1998). Antioxidative Polyphenols Isolated from Theobroma cacao. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(2), 454–457. doi.org/10.1021/jf970575o
- Sanchez, J.E., Daguinet, G., Guiraud, J.P., Vincent, J.C., Galzy, P., (1985). A study of the yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* *18*, 69–75.
- Sánchez, M.-T., Pérez-Marín, D., Torres, I., Gil, B., Garrido-Varo, A., & De La Haba, M.-J. (2017). Use of NIRS technology for on-vine measurement of nitrate content and other internal quality parameters in intact summer squash for baby food production. *Postharvest Biology and Technology*, *125*, 122–128. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.11.011
- Sanchez, J.E., Daguinet, G., Guiraud, J.P., Vincent, J.C., Galzy, P., 1985. A study of the yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* *18*, 69–75.
- Schinella, G., Mosca, S., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M. Á., Muguera, B., Ramón, D., & Ríos, J. L. (2010). Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, *43*(6), 1614–1623. doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.032
- Serra Bonvehí, J., & Ventura Coll, F. (1997). Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chemistry*, *60*(3), 365–370. doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00353-6
- Simons, F. E., Becker, A. B., Simons, K. J., & Gillespie, C. A. (1985). The bronchodilator effect and pharmacokinetics of theobromine in young patients with asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *76*(5), 703–707.
- Somarrriba, E. and Calvo, G. (1998). Enriching the cocoa plantation with timber shade

- trees. *Agroforesteria en las Americas (CATIE)*. 5(19):28–31.
- Spiller, G.A. (1998). Basic metabolism and physiological effects of the methylxanthines. In G.A. Spiller (Ed.). *Caffeine* (pp. 225-231) Boca Raton: CRC Press.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295. doi.org/10.1002/jssc.200700261
- Sunoj, S., Igathinathane, C., & Visvanathan, R. (2016). Nondestructive determination of cocoa bean quality using FT-NIR spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*, 124, 234–242. doi.org/10.1016/j.compag.2016.04.012
- Sukha, D.A., Butler D.R., Umaharan P. & Boulton E. (2008). The use of an optimized organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *Euro Food Research Technology*. 226:405-413.
- Tagro Guehi, S., Dingkuhn, M., Cros, E., Fourny, G., Ratomahenina, R., Moulin, G., & Vidal, A. C. (2008). *Impact of cocoa processing technologies in free fatty acids formation in stored raw cocoa beans*. *African Journal of Agricultural Research* (Vol. 3).
- Teye, E., & Huang, X. (2015). Novel Prediction of Total Fat Content in Cocoa Beans by FT-NIR Spectroscopy Based on Effective Spectral Selection Multivariate Regression. *Food Analytical Methods*, 8(4), 945–953. doi.org/10.1007/s12161-014-9933-4
- Teye, E., Huang, X., Dai, H., & Chen, Q. (2013). Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 183–189. doi.org/10.1016/j.saa.2013.05.063
- Teye, E., Huang, X., Han, F., & Botchway, F. (2014). Discrimination of Cocoa Beans According to Geographical Origin by Electronic Tongue and Multivariate Algorithms. *Food Analytical Methods*, 7(2), 360–365. doi.org/10.1007/s12161-013-9634-4
- Teye, E., Huang, X., Sam-Amoah, L. K., Takrama, J., Boison, D., Botchway, F., & Kumi, F. (2015). Estimating cocoa bean parameters by FT-NIRS and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 176, 403–410.

doi.org/10.1016/J.foodchem.2014.12.042

- Teye, E., Huang, X., Takrama, J., & Haiyang, G. (2014). Integrating NIR spectroscopy and electronic tongue together with chemometric analysis for accurate classification of cocoa bean varieties. *Journal of Food Process Engineering*, 37(6), 560–566. doi.org/10.1111/jfpe.12109
- Teye, E., Huang, X. yi, Lei, W., & Dai, H. (2014). Feasibility study on the use of Fourier transform near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate and quantify adulteration in cocoa beans. *Food Research International*, 55, 288–293. doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.021
- Timbie, D. J., Sechrif, L., & Keeney, P. G. (1978). Application of High-Pressure Liquid Chromatography to the study of Variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *Journal of Food Science*, 43, 560–562. doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb02354.x
- Tomlins, K. I., Baker, D. M., Daplyn, P., & Adomako, D. (1993). Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. *Food Chemistry*, 46(3), 257–263. doi.org/10.1016/0308-8146(93)90116-W
- Uwadaira, Y., Sekiyama, Y., & Ikehata, A. (2018). An examination of the principle of non-destructive flesh firmness measurement of peach fruit by using VIS-NIR spectroscopy. *Heliyon*, 4(2). doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00531
- Welsh, E. J., Bara, A., Barley, E., & Cates, C. J. (2010). Caffeine for asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), CD001112. doi.org/10.1002/14651858.CD001112.pub2
- Whitacre, E., Liver, J. O., Van Den Broek, R., Van Engelen, P., Remers, B. K., Van Der Horst, B., ... Jansen-Beuvink, A. (2003). Predictive Analysis of Cocoa Procyanidins Using Near-Infrared Spectroscopy Techniques. *Journal of Food Science*, 68(9), 2618–2622. doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05779.x
- Williams, P.K. Norris, in: I. Murray, P.C. Williams (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, American Association of Cereal Chemists, Inc., 1987, pp. 29–33 (Chapter 2).
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423–447.

[doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)

Wood, G. A. R., & Lass, R. A. (Eds.). (2001). *Cocoa*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. doi.org/10.1002/9780470698983

Yanes G.M. 1994. El cacao; origen, cultivo e industrialización. UJAT. Villahermosa, Tabasco, México. 87 p.

Zak, D. L., & Keeney, P. G. (1976). Changes in Cocoa Proteins during Ripening of fruit, Fermentation, and Further Processing of Cocoa Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(3), 483–486. doi.org/10.1021/jf60205a056

Żyżelewicz, D., Zakłós-Szyda, M., Juśkiewicz, J., Bojczuk, M., Oracz, J., Budryn, G., ... Jurgoński, A. (2016). Cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) phenolic extracts as PTP1B inhibitors, hepatic HepG2 and pancreatic β -TC3 cell cytoprotective agents and their influence on oxidative stress in rats. *Food Research International*, 89, 946–957. doi.org/10.1016/J.foodres.2016.01.009

5. Objetivos

5. OBJETIVOS

El objetivo principal de la tesis es poner a punto técnicas analíticas y de procesos para el estudio de los componentes bioactivos del grano de cacao fermentado y seco, tanto en cotiledón como en cascarilla, como factor de calidad y para la revalorización de la cascarilla.

Para alcanzar este objetivo, se identificaron los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar los parámetros de calidad del cotiledón y cascarilla en genotipos procedentes del Banco de Germoplasma de cacao de México.
2. Obtener extractos enriquecidos en compuestos bioactivos a partir del grano de cacao seco y fermentado.
3. Determinar el potencial del extracto bioactivo como ingrediente de un alimento funcional.
4. Explorar el potencial de la tecnología NIRS para la evaluación de compuestos bioactivos en el grano de cacao intacto y en la cascarilla.

6. Resultados y discusión

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral se presentarán mediante el conjunto de artículos publicados y por publicarse. Estos se agruparán en dos bloques de acuerdo al tema estudiado.

6.1. Identificación, extracción y caracterización de compuestos bioactivos del cacao

6.1.1. Capítulo 1:

Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk.

Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G.

Food Chemistry, 2018, 240: 831-839

6.1.2. Capítulo 2:

Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract.

Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria A., Azpeitia-Morales A. & Rodríguez-Gutiérrez, G.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. Online: (wileyonlinelibrary.com)
DOI 10.1002/jsfa.9191

6.1.3. Capítulo 3:

Extra virgin olive oil jam functionalized with cocoa bean husk extract rich in theobromine and phenols.

Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Prior, A., Fernández-Bolaños, J., Aguilera-Herrera, M.P. & Rodríguez-Gutiérrez, G.

6.2. Uso de la tecnología de espectroscopía de infrarrojo cercano para la clasificación del cacao en base a la riqueza en compuestos bioactivos

6.2.1. Capítulo 4:

Feasibility of Near Infrared Spectroscopy for fast classification of intact cocoa beans based on their content of bioactive compounds.

Hernández-Hernández, C. Fernández-Cabanás, V.M., Rodríguez-Gutiérrez, G. Bermúdez-Oria, A. & Morales-Sillero, A.

6.2.2. Capítulo 5:

Near Infrared Spectroscopy for the analysis of bioactive compounds in cocoa bean husk.

Hernández-Hernández, C., Fernández-Cabanás, V.M., Rodríguez-Gutiérrez, G., Bermúdez-Oria, A. & Morales-Sillero, A.

**6.1. Identificación, extracción y caracterización
de compuestos bioactivos del cacao**

6.1. Extracción y caracterización de compuestos bioactivos del cacao

Los granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) son una fuente importante de compuestos bioactivos, dentro de los cuales se pueden mencionar los fenoles como la catequina, epicatequina y sus derivados, así como las metilxantinas como la teobromina y la cafeína. Estos compuestos se caracterizan por presentar alta actividad antioxidante, antiradical y anticancerígena al igual que los presentes en otros frutos y vegetales. Aunque diversos estudios se han llevado a cabo respecto a la caracterización de compuestos bioactivos en el grano de cacao y sus derivados originarios de otras partes del mundo, poco se ha abordado este tema en el grano de cacao cultivado en México.

Por lo anterior el presente trabajo se comenzó llevando a cabo la identificación de los compuestos bioactivos presentes en una muestra homogénea representativa del grano de cacao fermentado y seco. Posteriormente se realizó un estudio comparativo de diversos métodos de extracción de compuestos bioactivos, en el cual se utilizaron distintas condiciones tanto de pH y temperatura como diferentes tipos de solventes. El estudio se llevó a cabo en el cotiledón desgrasado (Capítulo 1) y también en la cascarilla (Capítulo 2).

Una vez elegida la metodología con la que se recuperó la mayor cantidad de compuestos bioactivos, se llevó a cabo la cuantificación de los compuestos bioactivos identificados previamente en más de 80 muestras de cotiledón de cacao desgrasado provenientes de genotipos cultivados en el Banco de Germoplasma de México (Capítulo 1).

En la cascarilla del grano de cacao se encuentran concentrados una alta cantidad de compuestos bioactivos, principalmente debido a los fenómenos de difusión y solubilización desde el cotiledón hacia afuera durante la etapa de fermentación, razón por la que se procedió a estudiar la composición y cantidad de los mismos en esta parte del grano. Para ello se realizó también, como en el cotiledón, un estudio comparativo de diferentes métodos de extracción utilizando diferentes solventes, y posteriormente se procedió a la caracterización de los compuestos en la cascarilla de los genotipos anteriormente descritos. Con la finalidad de recuperar la máxima cantidad de compuestos bioactivos en la cascarilla, se llevó a cabo un estudio para comparar la eficiencia de extracción de diferentes tratamientos térmicos, y en algunos casos a alta presión utilizando un reactor cerrado de acero inoxidable (Capítulo 2).

6. Resultados y discusión

Una vez elegido el mejor tratamiento térmico para la recuperación de compuestos bioactivos en la cascarilla, se realizó la extracción a nivel piloto. El 50% del extracto obtenido se liofilizó, el restante 50% se adicionó con maltodextrina antes de liofilizar para obtener un extracto encapsulado. Ambos extractos se adicionaron a una mermelada elaborada a base de aceite de oliva virgen extra y agua para estudiar la estabilidad de los compuestos bioactivos durante 28 días (Capítulo 3).

Capítulo 1: Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk.

6.1.1. Capítulo 1:

*Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa
cotyledon and husk.*

Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G.

Food Chemistry, 2018, 240: 831-839

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol perenne ampliamente cultivado en América, Asia y África, de cuyos granos se extrae el ingrediente principal del chocolate. Los fenoles y las metilxantinas son los principales compuestos bioactivos presentes en sus semillas, los cuales son ampliamente reconocidos por sus efectos positivos sobre la salud debido a su capacidad antioxidante. Aunque es reconocido que estos compuestos bioactivos se encuentran almacenados en células del cotiledón, se ha demostrado que la cascarilla del grano es también rica en estos compuestos debido en gran parte a la difusión de los mismos durante la etapa de fermentación.

En México, a pesar de que actualmente solo se producen 27 mil toneladas de cacao en una superficie de 60 mil hectáreas distribuidas principalmente en los estados de Tabasco y Chiapas, es uno de los cultivos que tienen mayor potencial de ser cultivados en un futuro inmediato. Respecto al estudio del tema de compuestos bioactivos, se han encontrado algunas referencias relacionadas con grano de cacao comercial producido en México, sin embargo a nivel de genotipos existe escasa información.

En estudios realizados con cacao originario de otros países se han encontrado diversos contenidos en fenoles y metilxantinas después del procesado, lo cual puede dar como resultado grandes diferencias tanto en la calidad sensorial como industrial de grano. Por lo tanto en este estudio se llevó a cabo la comparación de diferentes métodos de extracción de compuestos bioactivos, y una vez elegido el mejor se realizó la caracterización de éstos en el grano de cacao (cotiledón) fermentado de 25

genotipos establecidos en el Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de México y una mezcla de grano comercial. También se determinó la actividad antioxidante del extracto bioactivo mediante DPPH. El mejor método que extrajo la mayor cantidad de teobromina y compuestos fenólicos individuales fue el realizado con el solvente metanol: agua 80:20 acidificado a pH 3. La teobromina fue el compuesto cuyos contenidos estuvieron presentes, de forma generalizada, en mayor cantidad, seguido por la epicatequina y la catequina. Se determinó también que los genotipos M031, M033 e INI10, cuyos contenidos de teobromina, epicatequina y catequina fueron los más altos, registraron la mayor actividad antioxidante, lo cual les da relevancia en vista de los beneficios de estos compuestos en la salud. Además de eso se identificaron cuatro derivados de la epicatequina cuya contribución en la actividad antioxidante es también significativa.

Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk.

Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., & Rodríguez-Gutiérrez, G.

ABSTRACT

A characterization of the phenolic profile of 25 cocoa genotypes established in a Mexican gene bank was carried out. From five different extraction methods commonly used for phenols, extraction with acidified methanol-water was chosen as the best to quantify the concentrations of theobromine and individual phenols in cocoa beans. High concentrations of individual and total phenols were found for genotypes original of Mexico (like RIM105, M031, and M033) or from Peru and Ecuador (INI10), but not the commercial mix (CAF), and were directly associated with their antioxidant activities. Despite the loss of some theobromine and phenols during fermentation, epicatechin remained in the fermented cotyledon in high concentrations. This study could help promote the commercialization of Mexican genotypes of cocoa and reports the possibility of upcycling fermented cocoa husks, which are rich in bioactive compounds and fiber, as novel functional extracts for use in food formulation or for nutraceutical purposes.

Keywords: cocoa genotypes, theobromine, flavonoids, antioxidant, phenolic extract, upcycling.

1. INTRODUCTION

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a perennial tree widely cultivated in America, Asia, and Africa, whose beans are extracted in order to produce the main ingredient of cocoa powder and chocolate (Cuatrecasas, 1964). Phenolic compounds constitute about 10% of cocoa beans and are responsible for their antioxidant, cardiovascular protective, antitumor, anti-inflammatory (Jolic, Redovnikovic, Markovic, Sipusic, & Delonga, 2011; Steinberg, Bearden, & Keen, 2003; Corti, Flammer, Hollenberg, & Luscher, 2009; Keen, Holt, Oteiza, Fraga, & Schimitsz, 2005; Selmi, Cocchi, Lanfredini, Keen, & Gershwin, 2008; Rusconi & Conti, 2010; Aprotosoiaie, Luca, & Miron, 2016), antineurodegeneratives (Nehlig, 2013), antibacterial, and anticariogenic properties (Ferrazamo, Amato, Ingenito, De Natale, & Pollio, 2009). Phenolic compounds are secondary metabolites that are stored in the pigmented cells of the cotyledon and which perform various functions at the plant, such as the regulation of its development, among others. Flavonoids are the largest and most diverse group of phenolic compounds found in the cocoa bean, which, depending on the structural composition of its central heterocyclic ring, oxidation state and glycosylation pattern, may be divided into six different subclasses including flavones, isoflavones, flavanones, flavon-3-ols, flavanols, and anthocyanins (Rice-Evans, 2004; Ignat, Volf and Popa et al., 2011; Oracz, Nebesny, & Żyżelewicz, 2015a).

The most common compounds in cocoa beans are the flavanols epicatechin, catechin, and procyanidins. According to various studies, epicatechin is the compound found in the greatest amounts in cocoa beans, representing about 35% of the total phenolic content, but other polyphenolic compounds have also been identified, including gallicocatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-O-gallate, quercetin, quercetin 3-glucoside, quercetin-3-arabinoside, clovamide, and deoxyclovamide (Sanbongi, Osakabe, Natsume, Takizawa, Gomi & Osawa, 1998; Oracz et al., 2015a).

Theobromine and caffeine are two compounds from the group of methylxanthines that are also present in cocoa (Timbie, Christ, & Kenney, 1978; Belscak, Komes, Horzic, Kovacevic, & Karlovic, 2009) whose physiological effects on the central nervous, cardiovascular, gastrointestinal, respiratory, and renal systems are well known (Nehlig, Dava, & Debry, 1992; Spiller, 1998; Nehlig, 2013).

The phenolic profile in foods, including cocoa, may be affected by various factors: environmental (origin of the sample, variety, maturity, and climate) and processing (roasting, tempering, alkalization, and storage) (Oracz, Żyżelewicz, & Nebesny,

2015b; Rusconi, & Conti, 2010; Jolic et al., 2011). Flavonoids are water soluble and highly susceptible to enzymatic and non-enzymatic oxidation (Oracz et al., 2015a). It is estimated that the phenolic content can be reduced from 100 to 10% during the manufacturing process of cocoa (fermentation, drying, and roasting) (Rusconi & Conti, 2010; Oracz et al., 2015b; Afoakwa, Ofoosu-Ansah, Budo, Mensah-Brown, & Takrama 2015). This can be caused by the presence of the enzyme polyphenoloxidase, epicatechin epimerization caused by pH changes during the fermentation process, and the polymerization of quinones during drying, among other reasons (Oracz et al., 2015b; Afoakwa et al., 2015).

According to Forsyth, Quesnel and Roberts (1958) and Nazaruddin et al. (2006) phenolic compounds are stored in the cotyledons of the cocoa seeds, however during the fermentation occurs the loss of the same amount by the diffusion of these compounds out of the cotyledon. Therefore, a part of the phenols present in the cotyledon can migrate to the husk turning into a material rich in these bioactive compounds afterwards. Phenolic compounds that have been identified in methanol extracts have been epicatechin and p-hydroxybenzoic acid. Similarly, theobromine is an important compound in the husk, whose content is around 12.9 mg /g (Arlorio et al., 2005).

Each genotype of cocoa has its own distinguishing characteristics including bean size, chemical composition, organoleptic properties, and degree of fermentation. In Mexico one of the agricultural products with the greatest potential for cultivation in tropical regions is cocoa. In fact, *Theobroma cacao* is now grown in an area of about 60,000 hectares, mainly distributed in the states of Tabasco and Chiapas, and yields a production volume of 27,000 tons of cocoa beans (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2015). Although several studies have focused on the study of the phenolic compounds of the cocoa beans commercially produced in Mexico (Ramírez, Cely Niño, & Ramírez, 2013; Romero-Cortes et al., 2013; Quiroz, Aguilar, Ramírez, & Ronquillo, 2013), no study has yet to carry out a characterization by genotype. Several studies on different genotypes of cocoa in other countries report varied results for the content of phenols and methylxanthines after processing, which give rise to big differences in terms of sensory characteristics and the final quality of the beans (Cruz, Paula Bacelar, Sergio Eduardo, & Eliete da Silva, 2015). Therefore, the characterization of the phenolic profile of Mexican cocoa genotypes established in a national gene bank could have utility in clonal selection, and the phenolic profile and antioxidant capacity of the genotypes

could be used as a marker of nutraceutical quality. To this end, this study contributes to the characterization of the phenolic profile of 25 genotypes and one commercial mix of fermented cocoa harvested in the Gene Bank of the Mexican National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock. A comparison of different methods of extraction of phenolic compounds in a homogeneous sample of cocoa beans was first performed; then the most effective extraction methods were chosen for the subsequent characterization of phenols and the phenolic profile of the 25 different Mexican genotypes of cocoa selected and a commercial mix used in Mexico.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples

Twenty-five different genotypes of dry and fermented cacao were used (Table 1) in comparison with a commercial mix sample fermented (CAF) or non-fermented (CAL). All of them were harvested in the 2012–2013 season and belong to the Germplasm *Bank of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP)*, Huimanguillo, Mexico. The samples were fermented and dried following the industrial method (Arana-Sánchez, et al., 2015; Hernández-Hernández et al., 2016), namely the fermentation of the cocoa beans for six days in wood boxes and subsequent natural drying for five days in wooden platforms with up to 7% humidity. During the natural drying, the temperature was maintained at 55 ° C and the air humidity at 70% (Arana-Sánchez, et al., 2015; Hernández-Hernández et al., 2016). Cocoa beans husk was obtained from the same fermented and some non-fermented samples.

2.2. Chemicals

The standards of gallic acid (GA), caffeic acid, (-)-epicatechin, (+)-catechin hydrate and theobromine, trifluoroacetic acid (TFA), anthrone and Folin-Ciocalteu's phenol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Na₂CO₃, ethanol and methanol were from Panreac Quimica S.A. (Barcelona, Spain). Concentrated HCl was purchased from Fluka (Switzerland). Acetonitrile was of HPLC grade purity (Romyl, Teknokroma, Barcelona, Spain) and acetone was obtained from Sharlau (Barcelo, Spain).

Table 1. Origin, crosses, crop, and morphology of each genotype of cocoa studied.

	Origin	Crosses	Color	Weight (g/cotyledon)	Husk %	Shape	Crop locus
CAF	FOREIGN	N.A.	VIOLET	1.08	14.07	ELLIPTICAL	TABASCO AND NORTHERN CHIAPAS
CONA 1	MEXICO	N.A.	IVORY	1.10	28.36	ELLIPTICAL	TABASCO
CONA 2	MEXICO	N.A.	DEEP VIOLET	1.39	15.30	OVOID	TABASCO
CRC	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	1.51	15.72	ELLIPTICAL	TABASCO
CRP	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	1.14	17.13	ELLIPTICAL	TABASCO
INI1	MEXICO AND ECUADOR	RIM 76A (MEXICO) x EET400 (ECUADOR)	DEEP VIOLET	1.14	19.23	ELLIPTICAL	TABASCO
INI4	MEXICO AND PERÚ	RIM 76 (MEXICO) x POUND 7 (PERU)	SLIGHTLY VIOLET	1.34	17.25	OVOID	TABASCO
INI9	MEXICO AND COLOMBIA	RIM 75 (MEXICO)x SPA 9 (COLOMBIA)	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	2.20	14.62	ELLIPTICAL	TABASCO
INI10	PERU AND ECUADOR	POUND 7 (PERU) x EET48 (ECUADOR)	DEEP VIOLET	0.98	17.71	OVOID	TABASCO
INI8	MEXICO Y ECUADOR	RIM 76A (MEXICO) x EET48 (ECUADOR)	SLIGHTLY VIOLET	1.63	14.86	OVOID	TABASCO
M001	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	0.92	11.28	OVOID	CHIAPAS
M002	MEXICO	N.A.	VIOLET	1.11	13.00		CHIAPAS
M003	MEXICO	N.A.	IVORY AND VIOLET	1.06	14.93	ELLIPTICAL	CHIAPAS
M008	MEXICO	N.A.	SLIGHTLY VIOLET AND VIOLET	1.31	13.72	OVOID	CHIAPAS
M022	MEXICO	N.A.	VIOLET	1.10	16.30	ELLIPTICAL	CHIAPAS
M024	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	1.00	17.33	ELLIPTICAL	CHIAPAS
M025	MEXICO	N.A.	SLIGHTLY VIOLET AND VIOLET	0.82	11.41	ELLIPTICAL	CHIAPAS
M026	MEXICO	N.A.	SLIGHTLY VIOLET	1.08	17.34	OVOID	CHIAPAS
M028	MEXICO	N.A.	IVORY	1.16	15.74	OVOID	CHIAPAS
M029	MEXICO	N.A.	SLIGHTLY VIOLET	1.20	43.91	ELLIPTICAL	CHIAPAS
M031	MEXICO	N.A.	VIOLET	1.00	19.48	ELLIPTICAL	CHIAPAS
M032	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	1.02	13.09	ELLIPTICAL	CHIAPAS
M033	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	1.17	14.02	ELLIPTICAL	CHIAPAS
RIM 44	MEXICO	N.A.	IVORY	0.99	10.71	ELLIPTICAL	CHIAPAS
RIM 88	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	1.42	12.85	ELLIPTICAL	CHIAPAS
RIM 105	MEXICO	N.A.	IVORY AND SLIGHTLY VIOLET	1.16	15.20	ELLIPTICAL	CHIAPAS

2.3. Extraction methods

The samples of cocoa seed and cocoa husk were manually separated, milled, and homogenized to a particle size of 0.5 μm for the extraction using five different methods. Seeds and husk were milled separately by a mill (Culatti, Italia), then were winnowed by a 0.5 μm sieve. The cocoa seed samples were defatted by extraction with n-hexane for six hours using a Soxhlet apparatus.

Method A. Methanol-water extraction. 1 gram of cocoa seed or cocoa husk sample was extracted twice with 3 mL of methanol-water 80:20 (v/v) at 70 °C for one hour with stirring. The two filtered liquids were pooled to form the final extract.

Method B. Ethanol-acidified water extraction. 1 gram of cocoa seed or cocoa husk sample was extracted with 5 mL of ethanol: water 30:70 (v/v) acidified up to pH 3 with concentrated HCl. After stirring for two hours at room temperature, the mix was filtered and the solid was extracted again with acetone: water 70:30 (v/v). The liquids obtained from both extractions were pooled.

Method C. Water extraction. 1 gram of cocoa seed or cocoa husk sample was extracted twice with 6 mL of distilled water with stirring at 70°C for one hour. The liquids obtained from each extraction were pooled.

Method D. Methanol-acidified water extraction. 1 gram of cocoa seed or cocoa husk sample was extracted using method A but acidified to pH 3 with HCl.

Method E. Acidified water extraction. 1 gram of cocoa seed or cocoa husk sample was extracted using method C but acidified to pH 3 with HCl.

2.4. Determination of total phenols

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method and was expressed as grams of gallic acid equivalents (Singleton & Rossi, 1965). 20 μ L of Method D extract (described above), then 80 μ L of Na₂CO₃ 0.7 M and 100 μ L of Folin-Ciocalteu reactive 0.2 M were added to a microplate. A microplate reader (Bio-Rad 550 model, Hercules, CA, US) was used for the absorbance measurements at 490 nm. Results were calculated with an equation obtained of a calibration curve whose concentrations ranged from 0 to 100 mg of gallic acid.

2.5. Analysis of phenols

HPLC-DAD: Phenols were quantified using a Varian Prostar liquid chromatography system with a C-18 column (*Kinetex[®] Biphenyl* 100 Å, 250 mm x 4.6 mm, i.d. 5 μ m) and diode array detector (DAD; the wavelengths used for quantification were 254, 280, and 340 nm) with automatic Rheodyne injection valves (20 μ L loop). The mobile phases were 0.01 % trichloroacetic acid in water (A) and acetonitrile (B), utilizing the following gradient over a total run time of 55 min expressed as % of A, being the rest of this % the phase B: 95 % A initially, 75 % A in 30 min, 50 % A in 45 min, 0 % A in 47 min, 75 % A in 50 min, and 95 % A in 52 min until completion of the run. Quantification was carried out by integration of the peaks at different wavelengths in function of the compounds, with reference to calibrations made using external standards. Calibration curves at concentrations ranging from 0 to 2 mg/mL (R=0,991) was made for theobromine, from 0 to 1 mg/mL (R \geq 0.990) were made for (-) epicatechin, (+)-catechin

and caffeic acid. The external standards used were theobromine, (-) epicatechin, (+)-catechin and caffeic acid. All determinations were carried out in triplicate and the samples were filtered (0.45 μm) before the analysis. For the theobromine and epicatechin quantification, the initial extract was diluted 1:4; for the other quantifications, no dilution was needed.

HPLC-MS: The phenolic compounds present in the different extracts were identified by electron impact mass data collected on a quadrupole mass analyzer (ZMD4, Micromass, Waters Inc.; Manchester, U.K.). Electron spray ionization (ESI) mass spectra were obtained at ionization energies of 50 and 100 eV in negative mode and 50 eV in positive mode; the capillary voltage was 3 kV, the desolvation temperature was 200 °C, the source temperature was 100 °C, and the extractor voltage was 12 V. The flow was maintained at 1 mL min⁻¹ in split mode (UV detector MS) for each analysis. The *Kinetex*[®] *Biphenyl* 100 Å C-18 column (250 mm x 4.6 mm i.d. 5 μm) was used. The mobile phases were 0.01% trichloroacetic acid in water and acetonitrile utilizing the same gradient used in HPLC-DAD.

2.6. Determination of antiradical activity

The antioxidant activity of each phenolic extract was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method as described in a previous study (Mrabet, García-Borrego, Jiménez-Araujo, Fernández-Bolaños, Sindic, & Rodríguez-Gutiérrez, 2017). 5 μL of sample and 195 μL of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were added to a microplate. Absorbance was measured in a microplate reader (Bio-Rad 550 model, Hercules, CA, US) after 30 minutes of reaction at 490 nm. This method is based on the measurement of the free-radical scavenging capacity of the antioxidant against the stable radical DPPH. The result of the activity of each extract was expressed as an EC₅₀ (effective concentration, mg/mL). The amount of extract necessary to decrease the initial absorbance by 50 %, EC₅₀, was calculated from a calibration curve by linear regression for each extract solution.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as mean values \pm standard deviations. STATGRAPHICS[®] plus software was used for statistical analyses. Comparisons amongst samples were made using one-way analysis of variance (ANOVA) and the LSD method. A p-value of 0.05 was considered significant.

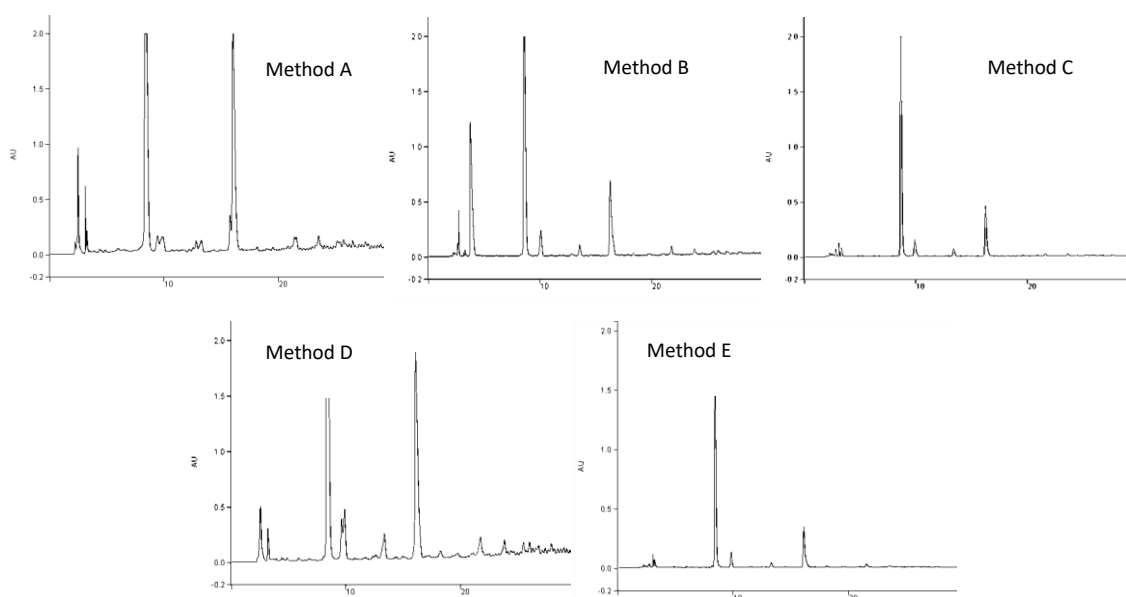
3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Extraction method comparison

A mix of the 25 different cocoa cotyledons and the commercial one was used to compare the five methods in terms of phenol and theobromine extraction.

After the extractions, the total phenolic content and the HPLC-UV profile were determined and compared for each method (Figure 1). Despite the higher values of total phenols obtained by method B, the best phenolic profile was achieved with method D, in which the peaks were significantly higher than those obtained with the other methods. Thus, method D was chosen for the phenolic quantification of the 25 cocoa genotypes and the commercial mix. The quantification of each phenolic compound obtained using the five different methods was also carried out with quantification using external standards (Figure 1). The major compound identified in the cocoa cotyledon samples was theobromine, followed by the flavonoids epicatechin and catechin and their derivatives. The proportion of these main components was similar in all the extractions, but method D extracted the highest concentration of all the quantified compounds. Acidification of the extraction solvent increased the concentration of phenolic compounds recovered in the case of methanol (compare results for methods A and D), allowing the quantification of caffeic acid and the catechin derivatives, but not in the case of distilled water (compare results for methods C and E), in which case only the concentration of catechin was increased.

The concentration of total phenols does not correspond to the sum of the individual phenols and, curiously, the highest value of total phenols was obtained with method B, for which the concentration of individual phenols (caffeic acid, catechin, epicatechin, epigallocatechin and derivatives) was lower in comparison to methods A and D. The colorimetric method for total phenol determination not only quantifies polymerized phenols that are not present in the UV-profile but also gives an error when the phenols are not isolated but rather present in a complex matrix with proteins and sugars (Sánchez-Rangel, Benavides, Heredia, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2013).



mg/g of	Extraction methods				
dry sample	A	B	C	D	E
Total Phenols**	14.64 ± 3.07bc	49.46 ± 2.50 a	5.77 ± 0.98d	20.39 ± 0.76b	9.40 ± 0.25cd
Theobromine	10.20 ± 0.41c	11.00 ± 0.04b	8.47 ± 0.01d	11.62 ± 0.25a	6.66 ± 0.12e
Caffeic acid	traces*	traces*	traces*	0.66 ± 0.01	traces*
Catechin	1.02 ± 0.01e	1.97 ± 0.02c	1.65 ± 0.03d	4.00 ± 0.01b	6.16 ± 0.14a
Epicatechin	15.84 ± 0.10b	9.00 ± 0.30c	6.93 ± 0.09e	17.70 ± 0.03a	7.04 ± 0.05d
Derivative I	traces*	traces*	traces*	3.54 ± 0.40	traces*
Derivative II	traces*	1.00 ± 0.02	traces*	1.62 ± 0.04	traces*
Derivative III	traces*	traces*	traces*	0.87 ± 0.06	traces*

*Value ≤ 0.01 mg/g of dry and defatted sample.

** Total phenols were determined by Folin-Ciocalteu method and refer to dry extract.

Figure 1. Phenolic profile of the cocoa cotyledon mix following HPLC-UV of the five different extraction methods. Concentration (mg/g of dry and defatted sample) of the identified components from cotyledon samples according to the five extraction methods (A to E). Derivatives I, II, and III are the catechin and epicatechin derivatives.

3.2. Identification and quantification of theobromine and phenols

A study of one cotyledon sample following extraction with method D with (CAF) and without (CAL) fermentation was used to identify all peaks by HPLC-MS (Figure 2). The complete profile of the non-fermented sample allowed the identification of theobromine and eight different phenolic compounds as shown in Figure 2. The HPLC-MS spectrum of the de-protonated molecule $[M-H]^-$ with ions (m/z 289) and (m/z 245) confirmed the presence of epicatechin and catechin as well as four of their derivatives with a retention time in the range of 21 to 26 minutes and a λ_{max} of 280 nm. Theobromine and caffeic acid showed a de-protonated molecule $[M-H]^-$ of the same ion (m/z 179) but at different λ_{max} , of 280 and 324 nm, respectively.

Table 2. Concentrations (mg/g of dry and defatted sample) of theobromine and phenols present in husk and cotyledon samples for one commercial mix sample of cocoa.

Samples	Theobromine	Caffeic acid	Catechin	Epicatechin	Deriv .I	Deriv. II	Deriv. III	Deriv. IV	Epigallocatechin
Cotyledon sample									
CAL (raw sample)	18.07 ± 0.01 ^a	traces ^b	1.27 ± 0.00	22.05 ± 0.39	2.99 ± 0.00	2.81 ± 0.04	0.88 ± 0.00	0.97 ± 0.01	1.72 ± 0.00
CAF (fermented sample)	9.79 ± 0.03	traces	1.48 ± 0.09	6.13 ± 0.08	0.49 ± 0.00	0.09 ± 0.00	traces	traces	traces
Husk sample									
CAL (raw sample)	3.90 ± 0.15	traces	nd ^c	4.20 ± 0.10	1.1±0.02	0.12±0.02	traces	traces	nd
CAF (fermented sample)	12.00 ± 0.10	traces	1.2±0.1	17.70 ± 0.10	0.2±0.02	0.12±0.02	traces	traces	0.20 ± 0.01
Total sample									
CAL (raw sample)	21.97 ± 0.03	traces	1.27 ± 0.00	26.25 ± 0.34	4.09 ± 0.01	3.01 ± 0.04	0.88 ± 0.00	0.97 ± 0.01	1.72 ± 0.00
CAF (fermented sample)	21.79 ± 0.07	traces	1.48 ± 0.09	23.83 ± 0.10	0.69 ± 0.01	0.21 ± 0.01	traces	traces	0.20 ± 0.01

^aStandard deviations (n=3); ^btraces: values detected ≤0.01 mg/g of dry and defatted sample; ^c nd: not detected.

Fermentation of the cotyledon is a natural process used to obtain the final cocoa seed for its commercialization. There are clear differences in the chromatograms of the fermented and non-fermented cotyledon samples (Figure 2), with the non-fermented sample having a richer profile. The concentrations of theobromine and phenolic compounds were also determined for the fermented and non-fermented cotyledon samples of husk and cotyledon for the same genotype (Table 2). All the values except for catechin diminished following the fermentation of cotyledon samples; this is in contrast to the husk sample, for which the concentration of phenolic compounds tended to increase after fermentation, particularly in the case of catechin. The reduction of these compounds in cotyledon following fermentation has been reported previously (Forsyth & Quesnel, 1957; Kim & Keeney, 1984; Elwers, Zambrano, Rohsius, & Lieberei, 2009) and directly depends on the reaction time (Brunetto et al., 2007). The sum of the values for the total sample of cotyledon and husk are similar in beans with fermentation (CAF) and without fermentation (CAL) for the major components theobromine, catechin, and epicatechin, whereas the concentration of the derivatives and epigallocatechin are significantly different between CAF y CAL (Table 2). Nazaruddin and colleagues (2006) determined that the decrease of theobromine and caffeine in fermented cocoa cotyledon is due to their diffusion during the fermentation process. The considerable increase in the concentration of bioactive compounds in the husk after fermentation means that husk can be considered as a natural source of theobromine and phenols such as epicatechin. Previous studies have shown that cocoa husk extracts have antibacterial activity and can help to diminish the concentration of residual glucose for the prevention of tooth decay (Kim, Lee, Kim, Park, Kwon, & Lee, 2004; Matsumoto et al., 2004). Currently, cocoa husk is used for animal feed or is disposed of directly; thus, the presence of bioactive compounds in this by-product of cocoa bean production could be of interest for the upcycling of the final fiber-rich solid for food formulation or dietetic purposes.

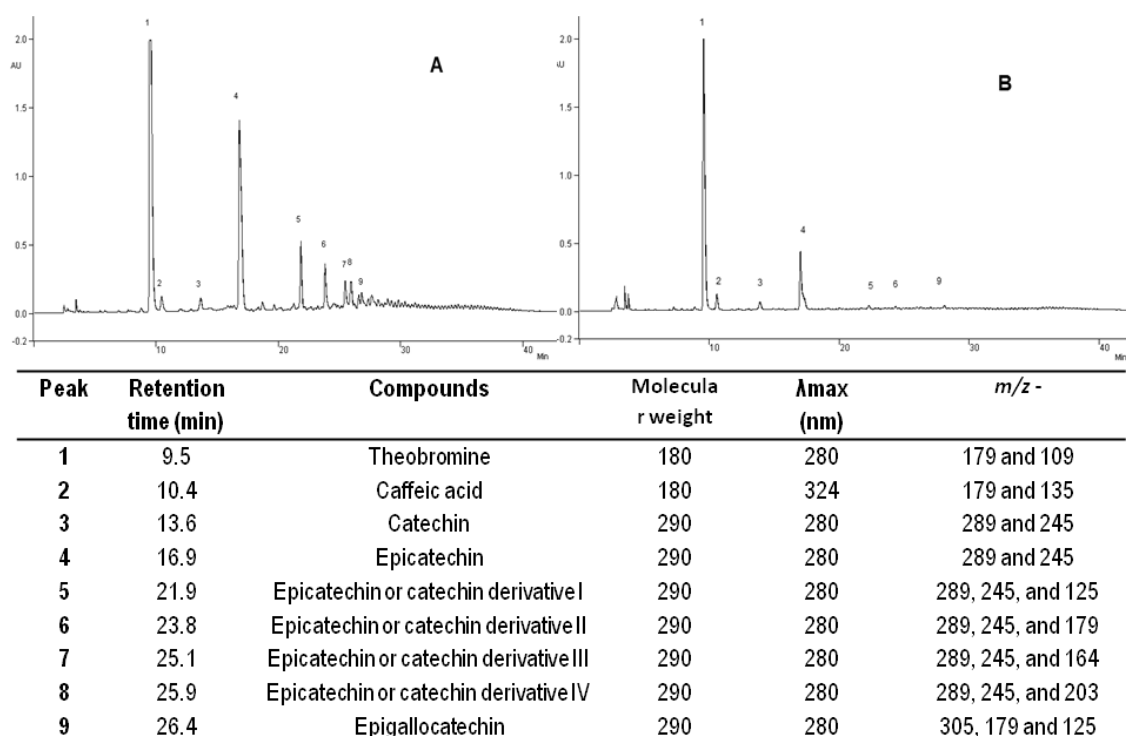


Figure 2. Phenolic profile at 280 nm of cotyledon, A) without fermentation and B) with fermentation. Theobromine and phenolic identification by HPLC-MS of the extract obtained from the cotyledon samples

The concentration of theobromine and the main phenols was determined for the fermented cotyledon of each of the 25 genotypes and the commercial mix using method D (Table 3). Theobromine was the major bioactive compound for most genotypes, with a range of 24.28 ± 0.01 and 9.79 ± 0.03 mg/g of dry and defatted sample. This *methylxanthine* is one of the most attractive molecules in cocoa because it is considered to be a diuretic, smooth muscle relaxant, myocardial stimulant, and vasodilator (Dorland, 2007).

The second most abundant compound was the flavonoid epicatechin, ranging widely across the different genotypes from 6.13 ± 0.08 to 51.57 ± 0.02 mg/g of dry and defatted sample, followed by catechin and their derivatives. The epicatechin concentrations were higher than the values found for fermented cotyledon genotypes from other countries (Elwers et al., 2009). Leaving aside the extraction method, this fact could make these Mexican genotypes particularly interesting because the concentration of the main phenol, epicatechin, is higher in the fermented cotyledon, and thus in the final cocoa product to be commercialized. Besides the well-known beneficial effects of these compounds on the vascular system and cerebral blood flow,

flavonoids have an effect on the inhibition of neuronal death by apoptosis induced by neurotoxicants and oxygen radicals, and promote neuronal survival and synaptic plasticity (Nehlig, 2013).

Relationships were observed between the determined compounds, such as between catechin and epicatechin as well as between theobromine and epicatechin, but not between the individual (caffeic acid, catechin, epicatechin, epigallocatechin and derivatives) and the total phenols (Figure 3). Samples of the RIM105, M031, and M033 genotypes were the most concentrated in theobromine, epicatechin, and catechin. These three genotypes are from Mexico and are currently cultivated in Chiapas. RIM105 and M033 are very similar in their morphology and color and different to the genotype M031 (Table 1). The INI10 genotype had some of the lowest concentrations of individual phenols, yet its total phenol concentration and antioxidant activity were the highest of all the genotypes studied (81.99 ± 5.03 mg/g of dry and defatted sample and $(EC_{50} 4.83 \pm 0.67)$, respectively). This genotype comes from Peru and Ecuador and has a particularly low weight of cotyledon and high percentage of husk (Table 1).

The cocoa sample with some of the lowest concentrations of bioactive compounds was CAF, although its concentration in total phenols was mid-range. Technically, CAF is not a genotype but rather a mix of commercial genotypes from Mexico and is commonly used in the Tabasco cacao industry. The sample of CAF shows a medium concentration of total phenols, but a low concentration of theobromine, epicatechin, and catechin.

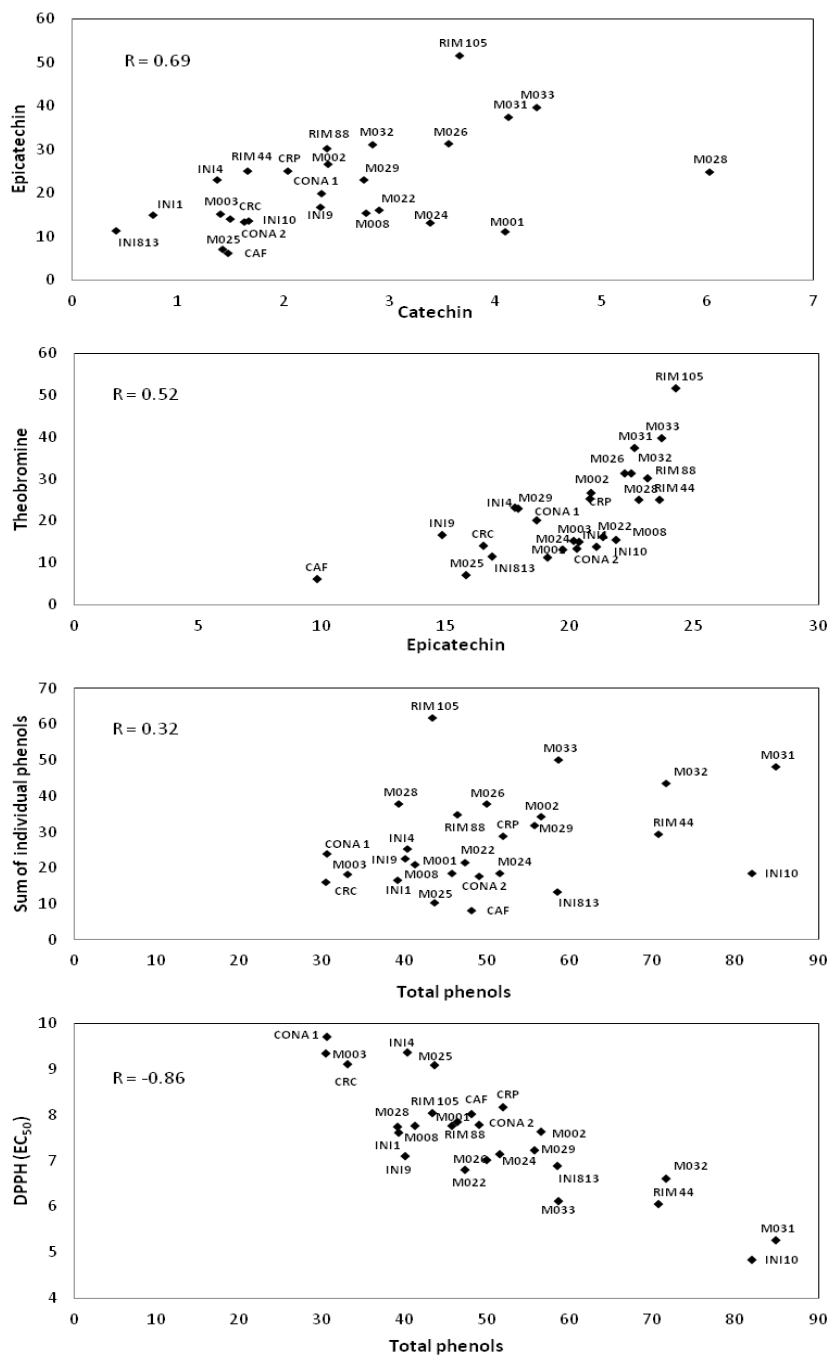


Figure 3. Pearson's correlation coefficients (R) between different components, total phenols, and antioxidant activity.

3.3. Antioxidant activity

Beside the phenolic concentration, another important aspect of cocoa is the antioxidant capacity of the cotyledon. The concentration of epicatechin has been related with the antioxidant activity (Othman, Jalil, Weng, Ismail, Ghani, & Adenan, 2010). All the genotypes have a high concentration of epicatechin except for the commercial mix (CAF), in which, probably the major part of this compound was transferred from the internal cotyledon to the husk during fermentation. Free radical *scavenging activity* was determined according to the quenching of *DPPH* radicals and used as a measure of the antioxidant capacity of each sample (Table 3). The results show that the genotypes previously identified as having the highest concentrations of theobromine, epicatechin, and catechin (M031, M033, and INI10) have some of the lowest EC_{50} values and consequently the highest antioxidant activities, significantly higher than the commercial CAF. However, RIM105 is the exception, having a low antioxidant activity (EC_{50} 8.03 ± 0.05) despite its high epicatechin concentration. The commercial mix of genotypes (CAF) had a low antioxidant activity but not the lowest among the genotypes studied (EC_{50} 8.02 ± 0.57). The direct relationship between the total phenolic concentration and antioxidant activity is shown in Figure 3. By other hand, the EC_{50} values showed for phenolic extracts obtained by other authors from different varieties of cocoa beans are in the range of 1.7-2.9 mg/mL for varieties from Malaysia, Ghana, Ivory Coast or Sulawesi (Othman et al., 2010) and 0.15-0.39 mg/mL for varieties from Ghana, Ivory Coast and Ecuador (Arlorio et al., 2008). These results are been obtained from organic extraction and present higher antioxidant capacity than the extracts obtained in this work. The presence of other compounds like sugars in the extract could be the reason for diminishing the activity; hence further purification must be done to increase the concentration of phenol in the extracts. The *in vitro* determination of the antioxidant capacity in aqueous solution gives an idea about the biological properties of each sample of fermented cotyledon. However, further assays would be required to determine each the real bioactivity of each genotype *in vitro* and *in vivo*.

Table 3. Concentrations (mg/g of dry and defatted sample) of theobromine, total phenols, and phenols for 26 genotypes of fermented cotyledon of cocoa. Derivative (Deriv.) IV and Epigallocatechin were found in traces in all samples. DPPH: Antioxidant activity (using the DPPH method) expressed as EC₅₀ in mg of dry extract/mL.

Genotype	Total phenols	Theobromine	Caffeic acid	Catechin	Epicatechin	Deriv. I	Deriv. II	Deriv. III	DPPH (EC ₅₀)
CAF	48.04 ± 2.63	9.79 ± 0.03 ^a	traces ^b	1.48 ± 0.09	6.13 ± 0.08	0.49 ± 0.00	0.09 ± 0.00	traces	8.02±0.57
CONA 1	30.61 ± 3.73	18.67 ± 0.02	0.42 ± 0.00	2.36 ± 0.03	19.98 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.35 ± 0.00	0.23 ± 0.00	9.69±0.76*
CONA 2	49.00 ± 1.68	20.29 ± 0.02	0.42 ± 0.00	1.63 ± 0.01	13.42 ± 0.02	0.90 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.38 ± 0.00	7.77±0.10
CRC	30.49 ± 6.73	16.51 ± 0.05	0.18 ± 0.00	1.49 ± 0.01	14.10 ± 0.00	0.34 ± 0.00	0.10 ± 0.00	traces	9.34±0.25*
CRP	51.94 ± 7.43	20.78 ± 0.01	0.78 ± 0.00	2.04 ± 0.01	25.12 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.32 ± 0.01	traces	8.17±0.31
INI1	39.08 ± 3.17	20.37 ± 0.01	traces	0.77 ± 0.00	14.89 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.40 ± 0.00	traces	7.74±0.25
INI4	40.35 ± 1.82	17.78 ± 0.04	0.12 ± 0.00	1.37 ± 0.00	23.04 ± 0.08	0.56 ± 0.00	0.35 ± 0.00	traces	9.36±0.73*
INI9	39.99 ± 1.93	14.83 ± 0.02	0.36 ± 0.00	2.35 ± 0.03	16.68 ± 0.04	2.15 ± 0.00	1.13 ± 0.00	traces	7.09±0.12
INI10	81.99 ± 5.03	21.07 ± 0.00	0.24 ± 0.00	1.67 ± 0.01	13.72 ± 0.03	1.78 ± 0.01	1.06 ± 0.00	traces	4.83±0.67**
INI8	58.39 ± 7.00	16.87 ± 0.22	0.54 ± 0.00	0.42 ± 0.00	11.38 ± 0.01	1.15 ± 0.01	traces	traces	6.87±0.42*
M001	45.64 ± 1.21	19.07 ± 0.04	0.24 ± 0.00	4.10 ± 0.03	11.11 ± 0.01	1.19 ± 0.01	0.09 ± 0.00	1.79 ± 0.00	7.75±0.74
M002	56.46 ± 4.05	20.84 ± 0.03	0.30 ± 0.00	2.42 ± 0.01	26.71 ± 0.02	1.43 ± 0.00	2.16 ± 0.03	1.40 ± 0.01	7.63±0.69
M003	33.08 ± 3.13	20.13 ± 0.02	traces	1.40 ± 0.02	15.28 ± 0.01	0.71 ± 0.00	0.79 ± 0.01	traces	9.10±0.45
M008	41.28 ± 4.45	21.85 ± 0.02	0.30 ± 0.00	2.78 ± 0.00	15.52 ± 0.08	1.21 ± 0.00	1.19 ± 0.01	traces	7.75±0.18
M022	47.28 ± 7.29	21.31 ± 0.03	0.54 ± 0.00	2.90 ± 0.02	16.02 ± 0.02	1.05 ± 0.00	0.91 ± 0.00	traces	6.80±0.61
M024	51.47 ± 2.58	19.70 ± 0.14	0.66 ± 0.00	3.38 ± 0.01	13.12 ± 0.86	0.91 ± 0.00	0.56 ± 0.01	traces	7.13±0.52
M025	43.59 ± 4.35	15.79 ± 0.21	traces	1.42 ± 0.01	7.06 ± 0.02	0.88 ± 0.01	0.91 ± 0.00	traces	9.07±0.11
M026	49.91 ± 2.17	22.21 ± 0.02	1.14 ± 0.00	3.56 ± 0.01	31.33 ± 0.10	0.85 ± 0.01	0.91 ± 0.00	traces	7.00±0.35
M028	39.29 ± 2.30	22.78 ± 0.04	traces	6.02 ± 0.00	24.87 ± 0.03	2.78 ± 0.01	2.09 ± 0.00	2.00 ± 0.00	7.61±0.04
M029	55.69 ± 2.47	17.90 ± 0.12	1.02 ± 0.00	2.77 ± 0.00	23.00 ± 0.07	2.13 ± 0.01	1.79 ± 0.00	1.12 ± 0.00	7.22±0.35
M031	84.95 ± 4.82	22.58 ± 0.04	0.90 ± 0.00	4.13 ± 0.00	37.46 ± 0.13	2.00 ± 0.01	2.07 ± 0.01	1.70 ± 0.01	5.25±0.04**
M032	71.66 ± 4.16	22.45 ± 0.11	traces	2.84 ± 0.00	31.25 ± 0.13	4.83 ± 0.00	3.41 ± 0.01	1.25 ± 0.00	6.61±0.18*
M033	58.65 ± 7.20	23.68 ± 0.01	traces	4.39 ± 0.04	39.77 ± 0.15	2.22 ± 0.01	1.88 ± 0.01	1.80 ± 0.00	6.10±0.21*
RIM 44	70.72 ± 9.97	23.59 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.66 ± 0.02	25.02 ± 0.02	1.03 ± 0.01	1.57 ± 0.00	traces	6.04±0.21*
RIM 88	46.40 ± 9.55	23.12 ± 0.08	0.54 ± 0.00	2.41 ± 0.01	30.17 ± 0.02	0.86 ± 0.01	0.81 ± 0.00	traces	7.85±0.46
RIM 105	43.35 ± 3.49	24.28 ± 0.01	1.02 ± 0.00	3.67 ± 0.00	51.57 ± 0.02	3.56 ± 0.01	2.03 ± 0.01	traces	8.03±0.05

^aStandard deviations (n=3); ^btraces: values detected ≤0.01 mg/g of dry and defatted sample; *significant difference ($p < 0.05$) and **($p < 0.005$) respect to CAF (commercial mix genotypes) sample.

4. CONCLUSION

Five different methods for phenolic extraction from cocoa beans were compared, and extraction with acidified methanol-water was shown to be the best method for quantifying the composition of the bioactive compounds theobromine and individual phenols of each genotype of cocoa cotyledon. This characterization identified theobromine as the major component of cocoa beans, followed by epicatechin and catechin phenolic compounds, with important differences established between the genotypes studied. Curiously, the commercial mix of genotypes, CAF, contained some of the lower concentrations of theobromine, epicatechin, and catechin. Samples of the genotypes RIM105, M031, and M033 were the most concentrated in theobromine, epicatechin, and catechin, and are Mexican in origin. The INI10 genotype had the highest concentration of total phenol and antioxidant activity. This study offers the opportunity to select new genotypes originating from Mexico based on their biological activity and favorable concentrations of bioactive and phenolic components, which are even higher following the fermentation process. Moreover, this study identified for the first time that cocoa husk has important concentrations of bioactive compounds after its fermentation, which, together with its high fiber content and antibacterial activity, could make it an interesting novel ingredient for the food industry to consider. Further studies should be carried out to determine the organoleptic properties of these genotypes and establish their commercial potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and co-funded by a European Social Fund (ESF) (project AGL2013-48291-R), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Ramon y Cajal Programme: (RyC 2012-10456), and the Mexican *National* Council of Science and Technology (CONACYT-Mexico).

REFERENCES

- Afoakwa, E.O., Ofosu-Ansah E., Budo A.S., Mensah-Brown H & Takrama J.F. (2015). Roasting effects on phenolic content and free radical scavenging activities of pulp pre-conditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 15, 9635-9650.
- Aprotosoiaie, A. C., Luca, S. V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products - An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 73-91.
- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., & Gschaedler-Mathis, A. (2015). Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World J Microbiol Biotechnol*, 31, 359-369.
- Arlorio, M., Coisson, J., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*, 38 (Third International Congress on Pigments in Food), 1009-1014.
- Arlorio, M.; Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coisson, J.-D.; D. Grosso E., Minassi A., Appendino G., Martelli A. (2008). Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-LDOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chem.* 106, 967–975.
- Belscak, A., Komes D., Horzic D., Kovacevic G. K. & Karlovic D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42, 707-716.
- Brunetto, M. R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Galignani, M., Zambrano, A., Gómez, A., Ramos, G., & Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100, 459-467.
- Corti, R., Flammer, A. J., Hollenberg, N. K., & Luscher, T. F. (2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*, 119, 1433-1441.
- Cruz, J. F. M., Paula Bacelar, L., Sergio Eduardo, S., & Eliete da Silva, B. (2015). Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao*, L) cultivars during fermentation. *Food Science and Technology*, 2, 279-284.

- Cuatrecasas, J. (1964). Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contributions from the United States National Herbarium*, 35, 379-614.
- Dorland, W. A. N. (2007). *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. Philadelphia PA: Saunders.
- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C., & Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Journal of Food Research and Technology*, 229, 237-948.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., De Natale, A., & Pollio, A. (2009). Review: Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia*, 80, 255-262.
- Forsyth, W. G. C. & Quesnel, V. C. (1957). Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8, 505-509.
- Hernandez- Hernandez, C., Lopez-Andrade, P. A., Ramirez-Guillermo, M. A., Guerra Ramirez, D., & Caballero Perez, J. F. (2016). Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in México. *Food Science & Nutrition*, 5, 690-695.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Jolic, S. M., Redovnikovic, I. R., Markovic, K., Sipusic, D. I., & Delonga, K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 1793-1800.
- Keen, C. L., Holt, R. R., Oteiza, P. L., Fraga, C. G., & Schimitsz, H. H. (2005) Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 298S-303S.
- Kim, H. & Keeney, P. G. (1984). Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science*, 49, 1090-1092.
- Kim, K. H., Lee, K. W., Kim, D. Y., Park, H. H. Kwon, I. B., & Lee, H. J. (2004). Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Process Biochemistry*, 39, 2043–2046.
- Matsumoto, M., Tsuji, M., Okuda, J., Sasaki, H., Nakano, K., Osawa, K., Shimura, S., & Ooshima, T. (2004). Inhibitory effects of cacao bean husk extract on plaque formation *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Oral Science*, 112, 249–252.

- Mrabet, A., García-Borrego, A., Jiménez-Araujo, A., Fernández-Bolaños, J., Sindic, M., & Rodríguez-Gutiérrez, G. (2017). Phenolic extracts obtained from thermally treated secondary varieties of dates: Antimicrobial and antioxidant properties. *LWT- Food Science and Technology*, 79, 416-422.
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp pre-conditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24, 87-94.
- Nehlig, A., Daval, J., & Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: Mechanism for action, biochemical, metabolic, and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17, 139-170.
- Nehlig, A. (2013). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75, 716-727.
- Oracz, J., Nebesny, E., & Żyżelewicz, D. (2015a). Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups affected by roasting conditions. *European Food Research and Technology*, 241, 663-681.
- Oracz, J., Żyżelewicz, D., & Nebesny, E. (2015b) The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and Processing Operations: A Review. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 55, 1176-1192.
- Othman A., Jalil, A. M. M., Weng, K. K., Ismail, A., Ghani, N. A., & Adenan, I. (2010). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *African Journal of Biotechnology*, 9, 1052-1059.
- Quiroz, R., Aguilar, M. A., Ramírez M. E., & Ronquillo E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12, 11-18.
- Ramírez, M. B., Cely Niño, V. H., & Ramírez, S. I. (2013). Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas, México. Antioxidant activity of clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.) fine and aromatic grown in the state of Chiapas-México. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15, 27-40.
- Rice-Evans, C. (2004). Serial Reviews: Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology And Medicine*, 36: 827-828.
- Romero-Cortes, T., Salgado-Cervantes, M. A., García-Alamilla, P., García-Alvarado, M. A., Rodríguez-Jimenes, G., Hidalgo-Morales, M., & Robles-Olvera, V.

- (2013). Relationship between fermentation index and other biochemical changes evaluated during the fermentation of Mexican cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2596-2604.
- Rusconi, M. & Conti, A. (2010) Review: *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61, 5-13.
- Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., & Osawa, T. (1998) Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 454-457.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Basilio Heredia, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5, 5990-5999.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Gobierno de México. (2015). Comunicado de prensa 395/15. Press release 395/15. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/2015/junio/Documents/2015B395.pdf>
- Selmi, C., Cocchi, C. A., Lanfredini, M., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2008). Chocolate at heart: The anti-inflammatory impact of cocoa flavanols. *Molecular Nutrition of Food Research*, 52, 1340-1348.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Spiller, G. A. (1998). Basic metabolism and physiological effects of the methylxanthines. In G.A. Spiller (Ed.). Caffeine (pp. 225-231) Boca Raton: CRC Press.
- Steinberg, F. M., Bearden, M. M., & Keen C. L. (2003). Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, 215-223.
- Timbie, D. J., Christ, L., & Kenney, P. G. (1978). Application of HPLC to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *Journal of Food Science*, 43, 560-565.

Capítulo 2: Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract

6.1.2. Capítulo 2:*Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract*

Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria A., Azpeitia-Morales A. & Rodríguez-Gutiérrez, G.

Journal of the Science of Food and Agriculture. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. Published online in: (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.9191

La cascarilla de cacao es la parte del grano que se separa junto con el germen del cotiledón antes o después de la etapa de tueste durante el proceso industrial y es el principal residuo de la industrialización del cacao. Si se considera que la cascarilla de cacao representa alrededor del 12 % del grano seco, de las 27 mil toneladas que se producen en México, se estarían generando alrededor de 3.240 toneladas de este desecho. En las regiones productoras de México, la cascarilla es usada escasamente como abono orgánico para las plantas y en la elaboración de galletas artesanales, sin embargo el resto es considerado, al igual que en otros países productores, como desecho. No obstante, existen otros usos potenciales, como la producción de pectinas, fibra dietética con propiedades antioxidantes, piensos, carbón activado para tratamiento de efluentes, biomasa soporte en procesos de filtrado, agentes inhibidores de caries y la producción de biogás.

En estudios realizados de forma preliminar a este capítulo, se ha demostrado que la cascarilla de cacao, después de la etapa de fermentación, puede ser una importante fuente de compuestos bioactivos como la teobromina, epicatequina y catequina además de su contenido en azúcares que incluiría a la fibra. Esto es debido a la difusión de una parte de ellos, durante la etapa de fermentación, junto con los exudados del grano (agua, azúcares y ácidos) desde el interior al exterior, durante el cual una gran cantidad de sustancias se quedan recogidas en la cascarilla. Debido a lo anterior, en este estudio además de realizar la caracterización de compuestos bioactivos en la cascarilla de del grano procedente de distintos genotipos de cacao cultivados en el Banco de Germoplasma ubicado en México, se llevó a cabo su

extracción. Se partió de un lote mayor de cascarilla, facilitado por una industria, comparando distintas condiciones de tratamientos térmicos, algunos en un reactor de acero inoxidable, con la finalidad de escoger el más eficiente en cuanto a cantidad extraída de fenoles y azúcares totales, fenoles individuales y teobromina, así como en base a su actividad antioxidante.

La caracterización de compuestos bioactivos como la teobromina, catequina y epicatequina en la cascarilla proveniente de diferentes genotipos de cacao reafirmó su presencia en cantidades considerables y altamente variables.

El tratamiento térmico con agua a 170°C durante un tiempo de reacción de 30 minutos, llevado a cabo en una planta piloto, se seleccionó como el más eficiente ya que extrajo la mayor cantidad de compuestos bioactivos (1,6 % de fenoles totales, 6,45 % de azúcares totales, 1.64 % de teobromina, 0.39 % de catequina y 0.39 % de epicatequina) y presentó la mayor actividad antioxidante. El hecho de haberse realizado a nivel piloto lo hace un método fácilmente escalable a nivel industrial por lo que es recomendable la extracción, bajo esta metodología, de compuestos bioactivos a partir de la cascarilla de cacao.

Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract

Hernández-Hernández, C., Morales-Sillero, A., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria A., Azpeitia-Morales A. & Rodríguez-Gutiérrez, G.

ABSTRACT

BACKGROUND: Cocoa bean husk (CBH) is the principal by-product of the cocoa industry and a significant agro-industrial residue. Using different hydrothermal treatments of CBH, we show that CBH is an important source of bioactive compounds including theobromine, epicatechin, and catechin.

RESULTS: Treatment over 150 °C significantly increased the yield of total and individual phenols and theobromine, as well as the antioxidant capacity of the liquid fraction. A total of 52 different genotypes of cocoa bean husk harvested in two seasons of production were analyzed. Overall, higher amounts of total phenols, theobromine, and epigallocatechin were detected in samples from the 2015 season while samples from 2014 had higher quantities of catechin and similar quantities of epicatechin.

CONCLUSION: CBH treatment at 170 °C for 30 minutes produces an antioxidant-rich extract, high in phenols (5.5 %), sugars (22 %), and theobromine (5.6 %) that is suitable for applications in the food, cosmetic or nutraceutical industries.

Keywords: cocoa bean husk, epicatechin, theobromine, hydrothermal treatment, cocoa genotypes.

INTRODUCTION

Cocoa bean husk (CBH) is the principal by-product of the cocoa industry and is considered an agro-industrial residue. CBH is part of the cocoa bean, separated from the cotyledons together with the germ during the pre-roasting process or after the roasting process of *Theobroma cacao*.¹ About 27,000 tons of dried cocoa beans are produced annually in Mexico (<http://infosiap.siap.gob.mx>), and if the CBH constitutes approximately 12 % of the beans' weight,² a total of 3240 tons of CBH residue are generated. In the cocoa producing regions of Mexico, there are some examples of artisanal CBH use, such as the making of cookies, and occasionally the production of organic fertilizer (bokashi) for local use. However, the vast majority of husks are disposed of as waste.

Our preliminary study on cocoa beans suggested that after its fermentation, CBH may be an important source of bioactive compounds, such as theobromine and phenols, which, together with the high fiber content and antibacterial activity of CBH make it an interesting novel ingredient for the food industry.³ Other studies also highlighted the potential application of some of CBH's properties within the field of nutraceutical foods, ranging from its high content of phenolic compounds, to around 18.2 mg g⁻¹ dietary fiber¹, such as cellulose, pectin, and lignin;⁴ high nutritional quality of fat (6.7 %), with a particularly high linoleic acid composition;⁵ and protein (17 %).

The phenolic compounds that have been identified in methanol extracts of CBH include epicatechin and p-hydroxybenzoic acid, and the theobromine content of CBH is around 12.9 mg g⁻¹.¹ It has been proved that phenolic compounds are stored in the cotyledons of the cocoa seeds.⁶ However, during fermentation, a significant amount of these compounds is lost by diffusion out of the cotyledon. In fact, part of the phenols present in the cotyledon migrate to the husk, converting CBH into a bioactive compound-rich material after fermentation.⁴

Recent studies on the potential uses of CBH indicate that it could be effectively employed in the development of activated carbon monoliths due to its lignocellulosic structure.⁷ In feed formulations for pigs in which CBH has been added, positive nutritional benefits have also been found, including an improvement of intestinal microbial balance.⁸

Other studies have focused on demonstrating the anticaries activity of CBH extracts, revealing that it reduces the development of almost all oral streptococci studied in humans by decreasing acid production. In addition, the synthesis of insoluble glucans

by the glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* is significantly inhibited by CBH extract.⁹⁻¹³ In the study carried out by Osawa et al.,¹⁰ in which the cariostatic substances present in the CBH were isolated and characterized, it was found that the fraction with the highest antiglycosyl-transferase activity was the one with the highest polyphenol content and the presence of epicatechin polymers with intermolecular bonds C-4 and C-8 (C-6). In other studies, the presence of proanthocyanidins like procyanidin B2 and cinnamtannin A2 were detected in CBH.¹⁴ Furthermore, Kopp and Bradbury¹⁵ patented a method for the extraction of a polyphenol-enriched or a theobromine-enriched fraction from CBH by extraction with an acidified ethanol solution.

Several studies have presented CBH as a potential source of bioactive compounds like theobromine, phenols, and the cell wall lignin, cellulose, and hemicellulose for use in the food, cosmetic or pharmaceutical industries, but no industrial treatment exists for the utilization of these valuable by-products. The aim of this work is to test industrial technologies like thermal treatment from 50 °C to 200 °C – currently applied for the utilization and valorization of other lignocellulosic by-products from the olive oil, asparagus or date industries^{16,17} – for the extraction of bioactive compounds from the cocoa bean husks of several Mexican genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Samples.

CBH was removed from cotyledon by hand, crushed with a mill (Culatti, Italy), and separated using a 0.5 micrometer screen.

A total of 52 CBH samples (at 7 % humidity) were extracted from different varieties of cacao, which were harvested in the 2013-2014 and 2014-2015 seasons, belonging to the Germplasm *Bank of* the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP), Huimanguillo, Mexico.

Chemicals.

The standards of gallic acid (GA), caffeic acid, (-)-epicatechin, (+)-catechin hydrate, theobromine, trifluoroacetic acid (TFA), anthrone, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Sodium bicarbonate (Na₂CO₃), ethanol, and methanol were from Panreac Quimica S.A. (Barcelona, Spain). Concentrated HCl was purchased from Fluka (Switzerland).

Acetonitrile was of HPLC-grade purity (Romyl, Teknokroma, Barcelona, Spain) and acetone was obtained from Scharlau (Barcelona, Spain).

Phenolic extraction methods.

For the characterization, extracts were produced from a homogeneous sample of CHB by four different methods previously used with cacao cotyledon³ with the following solvents: methanol [Method A], ethanol-acetone at pH3 [Method B], water [Method C], methanol at pH 3 [Method D], and water at pH3 [Method E]. Methods A, B, C, D and E were carried out as described.³

Total phenolic contents.

The total phenol content was determined by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method¹⁸ and expressed as grams of gallic acid equivalents for the extracts obtained by Method D.

Total sugars.

Total sugars were analyzed by the Anthrone colorimetric method¹⁹ using a spectrophotometer (BIO-RAD iMark Microplate Reader, USA) for the extracts obtained by Method D.

Antiradical activity.

The antioxidant activity of each phenolic extract was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method as described in a previous study.¹⁸ This method is based on the measurement of the free-radical scavenging capacity of the antioxidant against the stable radical DPPH. A microplate reader (Bio-Rad 550 model, Hercules, CA, US) was used for the absorbance measurements. The result of the activity of each extract was expressed as an EC₅₀ (effective concentration, mg/mL). The amount of antioxidant necessary to decrease the initial absorbance by 50 % (EC₅₀) was calculated for each antioxidant solution from a calibration curve by linear regression.

Analysis of individual phenols

HPLC-DAD. Phenols were quantified using a Varian ProStar liquid chromatography system with a C-18 column (*Kinetex®Biphenyl*100 Å, 250 mm x 4.6 mm, i.d. 5 µm) and diode array detector (DAD; the wavelengths used for quantification were 254, 280, and

340 nm) with automatic Rheodyne injection valves (20 μ L loop). The mobile phases used were 0.01% trichloroacetic acid in water (A) and acetonitrile (B), using the following gradient over a total run time of 55 min: 95 % A and 5 % of B initially, 75 % A and 25 % of B in 30 min, 50 % A and 50 % of B in 45 min, 0 % A and 100 % of B in 47 min, 75 % A and 25 % of B in 95 min, and 95 % A and 5 % of B in 52 min until completion of the run. Quantification was carried out by integration of the peaks at different wavelengths in function of the compounds, with reference to calibrations made using external standards. Calibration curves were made for theobromine at concentrations ranging from 0 to 2 mg/mL ($r=0.99$), and for (-)-epicatechin and (+)-catechin from 0 to 1 mg/mL ($r\geq 0.99$). All determinations were carried out in triplicate and the samples were filtered (0.45 μ m) before analysis. For the theobromine and epicatechin quantifications, the initial extract was diluted 1:4; for the other quantifications, no dilution was needed.

Hydrothermal treatments.

For the extraction of valuable compounds, CBH was diluted 1:6 in water. The mixture was heated in a water bath to 50 °C, 70 °C or 90 °C, or heated to 120 °C in a Stuart sample concentrator (United Kingdom).

The characteristics of the equipment used for hydrothermal treatments at 150 °C, 170 °C and 200 °C were described in a previous study.¹⁹ In brief, the reactor has a 2 L capacity stainless steel reservoir that can operate at temperatures up to 240 °C and a maximum pressure of 4.2 MPa. Heating of the CBH was performed by direct injection of high-pressure and high-temperature steam. Samples (50 g) of CBH were loaded into the reactor and treated for 5 or 30 minutes for the treatment at 150 or 200 °C, respectively.

Statistical analysis.

Results were expressed as the mean \pm standard deviation of three replicates. SAS/STAT v9.2 (Cary, NC, USA) software for Windows was used for statistical analyses. Comparisons amongst samples were made using one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test. A p-value of 0.05 was considered to be statistically significant. Correlation coefficients between parameters were assessed by means of the Pearson Correlation test. Canonical discriminant analyses were carried out in 52 genotypes between eleven variables.

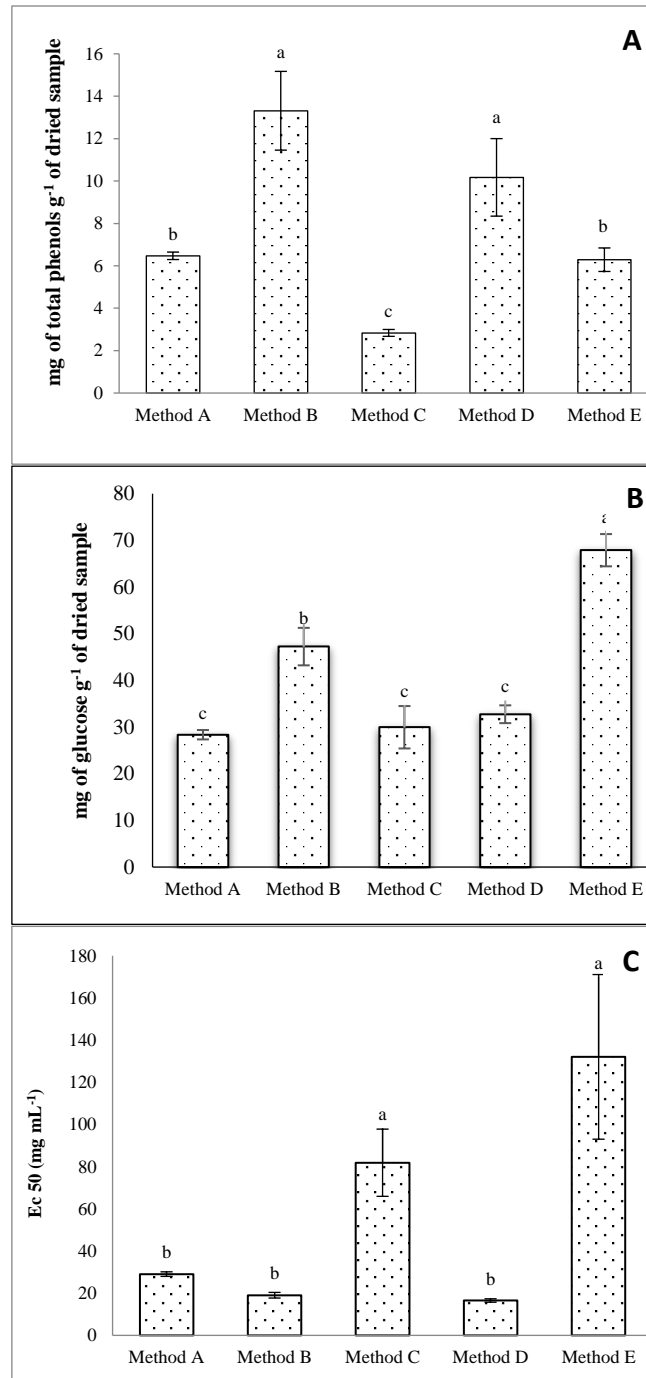
RESULTS AND DISCUSSIONS

Comparison of methods for quantifications.

Of the four phenolic extraction methods, Method B and Method D were the most effective for extracting total phenols from CBH (Figure 1A), yielding 13 and 11 mg g⁻¹ of total phenols, respectively (without a statistically significant difference). This experiment showed that ethanol-acetone and methanol were the most effective solvents for phenolic extraction from CBH. Our result demonstrating the effectiveness of methanol for phenol extraction from CBH corroborates the previous finding.²⁰ Using these extraction methods, a greater amount of phenolic acids were released by acid hydrolysis, which separates sugars and esters during hydrochloric acid treatment.²¹ Methods B and D yielded a greater amount of total phenols than reported by other studies, like the values reported by Manzano et al.²² (6.04 mg g⁻¹) for CHB extracted with water. For example, Martínez and colleagues²⁴ compared a mix of methanol:acetone with ethanol as extraction solvents, recovering a greater quantity of total phenols for methanol:acetone than ethanol, with yields of 1.50 mg g⁻¹ and 0.8 mg g⁻¹, respectively.²³

The antioxidant activity (Figure 1B), calculated as the 50 % effective concentration (EC₅₀), was higher in the extracts of Method B and Method D, with no significant differences between them, and corresponded to the higher amounts of total phenols in these extracts. These results correspond to those indicated by Azizah et al.,²⁰ who found that extraction with methanol produced the CBH extract with the highest antioxidant activity.

A significantly higher amount of total sugars (67.89 mg g⁻¹) was extracted using Method E (Figure 1C) with water acidified to pH 3 as solvent, following by Method B, then methods A, C, and D.



Means with the same letter are not significantly different. $\alpha = 0.05$. Total phenols are expressed as gallic acid equivalents.

Figure 1. Total phenols (A), total sugars (B), and antioxidant activity (DPPH) (C) of samples extracted from CBH by different methods.

Characterization of genotypes.

The total phenols and sugars in the CBH of the different cacao genotypes extracted using Method D, in which 80 % methanol at pH 3 was used as the solvent, are shown in Table 1. Method D was selected because it provided the optimum quantification of total phenols and sugars as well as the bioactive profile obtained by HPLC-DAD. For the 2014 genotypes, the highest amount of total phenols was extracted from INI 9 (17.34 mg g⁻¹), followed by M033 (14.02 mg g⁻¹) and M026 (13.61 mg g⁻¹) (p<0.05). The amount of total phenols in INI 9 was four times greater than in M031, the genotype with the lowest amount of total phenols (p<0.05). Arlorio et al.¹ reported similar quantities of total phenols (18.2 mg g⁻¹) in the CBH of commercial samples supplied by the Factory Ferrero SpA (Alba, Italy). The CAF and M033 husks had the highest antioxidant activity (19.87 and 19.88 mg mL⁻¹, respectively; p<0.05), although this value did not correspond with the phenolic content of the CAF genotypes, which have a relatively low phenolic content (6.33 mg g⁻¹). However, the lowest antioxidant activity was recorded in M031 whose phenolic content was also one of the lowest. The highest total sugars were extracted from the CRP (110.42 mg g⁻¹), RIM 44 (93.26 mg g⁻¹), and CRC (73.84 mg g⁻¹) genotypes. Lower amounts were recorded in the INI 4 (16.83 mg g⁻¹), INI 8 (17.00 mg g⁻¹), and INI 10 (18.04 mg g⁻¹) genotypes. The correlation between total phenols and DPPH, as determined by the Pearson Correlation test, was -0.56, which would indicate a moderate correlation between the total phenol content and antioxidant activity of CBH extracts.

Table 1. Total sugars, total phenols, and radical scavenging of DPPH (EC₅₀ expressed as mg/mL) in CBH extracts of different cocoa genotypes supplied by INIFAP, Mexico, in 2014 and 2015.

GENOTYPES 2014			GENOTYPES 2015				
Sample	Total phenols (mg g ⁻¹ of sample)	Antioxidant activity (mg mL ⁻¹ EC ₅₀)	Total sugars (mg g ⁻¹ of sample)	Sample	Total phenols (mg g ⁻¹ of sample)	Antioxidant activity (mg mL ⁻¹ EC ₅₀)	Total sugars (mg g ⁻¹ of sample)
CAF	6.33±0.98 [†] fghi	19.87±1.04 m	24.07±1.95 ijk	CRC 04/15	27.14±0.93 abcd	16.87±0.55 fgh	36.13±2.49 fghi
CONA 1	5.91±0.59 ghi	33.32±1.60 ghij	25.95±2.51 ghijk	F0 12/14	24.20±1.32 bcde	15.34±0.96 gh	23.67±9.12 hi
CONA 2	8.92±0.62 defgh	23.07±0.07 lm	31.64±0.75 fghijk	F7 12/14	15.23±1.77 efghij	38.35±3.84 bcd	35.53±2.36 fghi
CRC	8.50±0.81 defgh	37.73±2.24 efgh	73.84 ±3.50 bc	F7 07/15	11.96±1.93 hij	27.83±3.91 cdefg	44.82±2.08 fgh
CRP	13.26±1.19 bc	39.32±0.93 defg	110.42±3.15 a	F9 12/14	24.75±2.30 bcd	25.12±1.28 defg	100.0±17.11 cd
INI 1	7.27±0.14 efghi	38.86±0.73 defg	20.44±1.03 jk	F14 12/14	22.70±1.10 bcde	26.06±0.86 defg	35.70±2.33 fghi
INI 4	8.42±0.70 defghi	27.74±1.69 jkl	16.83±1.37 k	F14 03/15	12.67±0.70 ghij	40.93±1.28 bc	12.35±3.81 i
INI 8	10.58±1.96 bcde	29.75±1.99 ijk	17.00±0.33 k	F14 11/15	19.11±0.93 defgh	24.61±0.60 efg	61.99±8.68 ef
INI 9	17.34±3.49 a	32.40±1.58 hij	33.21±1.12 efghijk	F20 11/15	12.78±0.76 fghij	71.38±11.08 a	121.57±5.57 c
INI 10	10.22±0.87 bcde	25.93±0.06 klm	18.04±2.55 k	F21 12/14	21.39±4.67 cdefg	23.53±0.98 efg	41.70±1.90 fghi
M001	6.20±0.55 fghi	44.12±2.28 bcd	23.38±0.37 jk	F21 11/15	24.76±1.50 bcd	25.04±0.62 defg	97.23±15.48 cd
M002	9.90±1.35 odef	38.48±0.84 defgh	56.06±0.93 cde	F21 03/15	19.60±2.00 defgh	26.50±1.18 defg	29.20±2.85 ghi
M003	7.52±1.25 efghi	43.02±1.34 bcde	46.74±2.13 defghi	F28 12/14	17.92±0.95 defghij	27.82±1.38 cdefg	33.59±1.75 fghi
M008	6.15±0.38 fghi	42.04±1.58 bcde	44.76±3.49 defghi	F33 03/15	18.99±2.00 defghi	17.32±0.55 fgh	24.61±0.85 hi
M022	9.14±1.10 defg	29.38±1.50 ijkl	48.45±3.27 defgh	F33 12/15	18.53±0.95 defghij	19.52±0.12 fg	36.33±2.03 fghi
M024	8.98±0.90 defg	29.18±1.73 ijkl	40.18±7.73 defghijk	F42 03/15	24.06±2.95 bcde	26.54±0.60 defg	75.74±5.35 de
M025	4.48±1.45 i	41.61±0.52 cdef	25.20±5.12 hijk	F44 03/15	22.27±2.34 bcde	21.28±0.59efg	49.32±4.24 defgh
M026	13.61±1.46 abc	27.57±0.98 jkl	42.11±5.40 defghij	ICS95 12/14	24.42±2.70 bcde	20.73±1.87 fg	55.68±0.47 efg
M028	4.30±0.54 i	47.92±2.95 bc	52.33±5.13 cdef	ICS 95 06/15	9.47±0.71 j	44.56±1.73 b	20.84±1.60 hi
M029	5.12±0.97 hi	48.36±3.56 b	25.97±3.11 ghijk	INI 1 03/15	24.18±0.45 bcde	34.56±1.91 bcde	743.78±36.06 a
M031	3.86±0.54 i	72.23±5.27 a	32.53±4.91 efghijk	INI 2 03/15	9.58±0.87 ij	76.88±12.74 a	28.90±1.25 ghi
M032	6.29±0.22 fghi	35.41±2.59 fghi	61.64±8.30 cd	INI 8 03/15	34.88±3.34 a	5.59±0.31 h	28.42±1.03 ghi
M033	14.02±1.18 ab	19.88±2.45 m	51.51±6.68 cdef	PA 169 06/15	18.03±2.48 defghij	21.00±0.92 fg	25.60±2.01 ghi
RIM 44	5.83±0.16 ghi	38.56±0.43 defgh	93.26±0.00 ab	SIAL 22	11.27±0.60 hij	29.42±1.24 cdef	35.17±3.23 fghi
RIM 88	10.85±0.53 bcde	28.42±1.91 jkl	49.59±1.65 defg	SPA 9 06/15	30.76±2.02 abc	22.81±0.72 efg	200.82±14.06 b
RIM 105	11.91±2.04 bcd	25.93±1.49 klm	45.78±17.18 defghi	UF273 05/15	22.17±1.86 bcdef	19.81±0.68 fg	24.63±2.91 hi

[†]Standard deviations (n=3). n.d. not determined. Means with the same letter between lines are not significantly different. α=0.05

Overall, theobromine, catechin, and epicatechin were the major compounds found in the genotypes of CBH analyzed (Table 2). Smaller quantities of four epicatechin derivatives and epigallocatechin were also detected. These results are similar to those reported in cotyledon,³ although they were found in smaller amounts in husk. Arlorio et al.¹ pointed out that epicatechin is one of the major components in husk, but the contents reported (2.75 mg g⁻¹), were lower than those found in this work. The INI 9 genotype had the highest content of epicatechin and catechin, and one of the highest contents of theobromine (31.56 mg g⁻¹, 4.66 mg g⁻¹, and 11.18 mg g⁻¹, respectively; p<0.05) (Table 2). A similar quantity of theobromine was found in CBH (12.9 mg g⁻¹).¹ According to Timbie et al.,²⁴ changes in theobromine occur during sweat box fermentation, thus the decrease in the concentration of theobromine in the husk following fermentation is accountable. Theobromine is not soluble in water like the soluble polyphenols; nevertheless, cytological studies indicate that diffusion of this

compound is promoted during fermentation by a morphological rearrangement of lipid and aqueous phases.²⁵

Concerning the 2015 genotypes, the highest total phenol content in husks was recorded in INI 8 03/15 (34.88 mg g⁻¹), followed by SPA 9 (30.76 mg g⁻¹), and CRC (27.14 mg g⁻¹) (p<0.05). The 2015 genotypes with the lowest amounts of total phenols were ICS 95 06/15 (9.47 mg g⁻¹), INI 2 03/15 (9.58 mg g⁻¹), SIAL 22 (11.27 mg g⁻¹), and F7 07/15 (11.96 mg g⁻¹). Total sugars ranged from 12.35 mg g⁻¹ (F14 03/15) to 743.78 mg g⁻¹ (INI 1 03/15). The maximum antioxidant activity corresponded to the genotypes with the highest phenolic content, INI 8 03/15 (p<0.05); similarly, the lowest antioxidant activity corresponded to the genotype with the lowest phenolic content, INI 2 03/15 (p<0.05).

The correlation coefficient between the antioxidant activity (E_{C50}) and the total phenol content as determined by the Pearson Correlation test was -0.68, which indicates the high antioxidant power of CBH extracts with higher phenolic contents. These results are in agreement with those carried out by other groups, who also found a linear correlation between the content of *T. cacao* phenolic compounds and their antioxidant capacity.²⁴⁻²⁶

For the cocoa bean husks of the 2015 harvest, epicatechin, theobromine, and catechin were again the major compounds found (Table 2). Four epicatechin derivatives and epigallocatechin were also identified. Theobromine content ranged from 14.16 to 18.27 mg g⁻¹ for CRC 04/15 and F7 12/14, respectively, and no significant differences between the genotypes' theobromine contents were found. The highest content of epicatechin was found in INI 1 03/15 (34.97 mg g⁻¹) and the lowest in PA169 06/15 (4.40 mg g⁻¹). Catechin content ranged from 0.55 mg g⁻¹ to 3.33 mg g⁻¹ to, in INI 1 03/15 and INI 8 03/15, respectively.

Theobromine was present in higher concentration in the genotypes analyzed in 2014-2015 than the 2013-2014 season. This difference may be due to the varieties analyzed, the season, agronomic factors or the fermentation process; hence, further studies will be necessary to determine how the concentration of these bioactive compounds depend on these factors.

Table 2. Bioactive compounds profile (mg gallic acid equivalents g⁻¹ of sample) of CBH from different cocoa genotypes supplied by INIFAP, Mexico, in 2014 and 2015.

Year of harvest	Genotype	Theobromine	Catechin	Epicatechin	Epicatechin derivative I	Epicatechin derivative II	Epicatechin derivative III	Epicatechin derivative IV	Epigallocatechin
2014	CAF	9.25 ± 0.00 abcde	1.79 ± 0.00 defghi	9.53 ± 0.00 cd	0.03 ± 0.00 ab	0.13 ± 0.00 bcd	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 ab	0.05 ± 0.00 bc
	CONA 1	9.88±0.77 abcde	2.99 ± 0.82 bcd	15.63 ± 4.26 bcd	0.07 ± 0.01 ab	0.07 ± 0.02 cd	n.d. c	0.03 ± 0.00 ab	0.09 ± 0.10 bc
	CONA 2	10.26± 0.11 abcde	2.86 ± 0.32 bcdef	18.46 ± 0.33 abcd	0.12 ± 0.05 ab	0.09 ± 0.00 cd	Traces b	0.03 ± 0.00 ab	0.06 ± 0.01 bc
	CRC	11.74 ± 0.84 a	3.09 ± 0.14 bcd	25.23 ± 0.95 ab	0.12 ± 0.05 ab	0.10 ± 0.00 cd	Traces	Traces	traces
	CRP	10.59 ± 0.38 abcde	3.44 ± 0.11 abc	19.03 ± 8.04 abcd	0.27 ± 0.26 ab a	0.11 ± 0.10 cd	0.16 ± 0.11 b	n.d.	0.12 ± 0.12 bc
	INI1	7.62 ± 0.92 de	1.27 ± 0.18 ghi	13.70 ± 4.37 bcd	0.05 ± 0.07 ab	0.05 ± 0.07 cd	0.08 ± 0.06 b	n.d.	0.08 ± 0.09 bc
	INI4	10.13 ± 0.84 abcde	1.72 ± 0.21 defghi	17.48 ± 1.86 abcd	0.04 ± 0.05 ab	0.04 ± 0.05 cd	n.d.	traces	traces
	INI8	11.40 ± 1.03ab	3.59 ± 0.66 abc	19.67 ± 2.69 abcd	0.14 ± 0.04 ab	0.14 ± 0.04 bcd	0.11 ± 0.02 b	0.11 ± 0.05 ab	0.10 ± 0.03 bc
	INI9	11.18 ± 1.37 abc	4.66 ± 0.49 a	31.56 ± 5.09 a	0.16 ± 0.02 ab	0.16 ± 0.02 abcd	0.13 ± 0.01 b	0.19 ± 0.04 ab	0.13 ± 0.03 bc
	INI10	9.97 ± 2.00 abcde	1.71 ± 0.10 defghi	12.52 ± 0.29 bcd	0.11 ± 0.01 ab	0.11 ± 0.00 cd	0.04 ± 0.05 b	0.07 ± 0.02 ab	0.19 ± 0.00 abc
	M001	7.86 ± 0.66 cde	1.33 ± 0.02 ghi	12.16 ± 3.28 bcd	0.04 ± 0.00 ab	0.05 ± 0.06 cd	n.d.	n.d.	0.03 ± 0.05 bc
	M002	7.64 ± 0.20 de	0.83 ± 0.02 i	5.44 ± 0.04 d	0.25 ± 0.03 ab	0.02 ± 0.01 cd	0.02 ± 0.01 b	0.10 ± 0.06 ab	0.06 ± 0.02 bc
	M003	10.19 ± 0.51 abcde	1.08 ± 0.04 hi	13.80 ± 2.33 bcd	0.09 ± 0.11 ab	n.d.	n.d.	0.02 ± 0.00 ab	0.02 ± 0.00 bc
	M008	7.39 ± 0.51 e	1.52 ± 0.06 efghi	10.33 ± 0.18 cd	0.16 ± 0.06 ab	0.13 ± 0.01 bcd	0.13 ± 0.05 b	0.07 ± 0.04 ab	0.05 ± 0.04 bc
	M022	9.75 ± 0.48 abcde	2.90 ± 0.38 bcde	15.40 ± 6.19 bcd	0.23 ± 0.01 ab	0.19 ± 0.10 abc	0.11 ± 0.01 b	0.10 ± 0.02 ab	0.24 ± 0.19 ab
	M024	9.53 ± 0.64 abcde	2.41 ± 0.34 bcdefgh	14.22 ± 1.24 bcd	0.06 ± 0.04 ab	0.09 ± 0.07 cd	0.10 ± 0.00 b	0.08 ± 0.11 ab	0.08 ± 0.10 bc
	M025	8.20 ± 1.00 bcde	1.24 ± 0.06 ghi	9.76 ± 1.49 cd	Traces	n.d.	0.02 ± 0.02 b	0.05 ± 0.07 ab	0.02 ± 0.00 bc
	M026	11.05 ± 0.82 abc	3.69 ± 0.61 ab	18.87 ± 9.72 abcd	0.03 ± 0.04 ab	0.14 ± 0.05 bcd	0.13 ± 0.05 b	0.07 ± 0.10 ab	0.15 ± 0.02 bc
	M028	8.77 ± 0.09 abcde	3.47 ± 0.02 abc	16.04 ± 1.27 bcd	0.19 ± 0.02 ab	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	M029	7.92 ± 1.30 cde	1.51 ± 0.10 fghi	11.72 ± 2.51 bcd	0.03 ± 0.00 ab	n.d.	Traces	0.08 ± 0.04 ab	0.05 ± 0.01 bc
M031	8.77 ± 0.57 abcde	2.23 ± 0.08 cdefgh	12.21 ± 1.89 bcd	0.08 ± 0.00 ab	n.d.	Traces	n.d.	n.d.	
M032	9.92 ± 0.00 abcde	1.17 ± 0.00 ghi	15.81 ± 0.00 bcd	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.04 ± 0.00 bc	

	M033	10.50 ± 0.77 abcde	3.59 ± 0.46 abc	12.34 ± 1.56 bcd	0.15 ± 0.07 ab	0.34 ± 0.01 a	0.41 ± 0.13 a	0.21 ± 0.16 a	0.41 ± 0.04 a
	RIM 44	7.67 ± 0.55 de	1.19 ± 0.04 ghi	12.18 ± 4.33 bcd	Traces	Traces	0.02 ± 0.03 b	traces	0.04 ± 0.02 bc
	RIM 88	10.59 ± 1.23 abcde	2.48 ± 0.71 bcdefg	21.32 ± 1.24 abc	0.04 ± 0.00 ab	0.31 ± 0.11 ab	0.03 ± 0.01 b	0.03 ± 0.02 ab	0.06 ± 0.03 bc
	RIM 105	10.89 ± 0.04 abcd	1.75 ± 0.03 defghi	17.71 ± 0.22 abcd	0.07 ± 0.01 ab	0.09 ± 0.01 cd	0.09 ± 0.02 b	0.06 ± 0.00 ab	0.06 ± 0.00 bc
2015	CRC 04/15	18.27 ± 2.01 a	2.85 ± 0.00 ab	21.17 ± 5.46 abc	0.27 ± 0.02 b	0.22 ± 0.09 a	0.12 ± 0.05 a	0.02 ± 0.03 d	0.28 ± 0.01 ab
	F0 12/14	15.35 ± 0.22 a	1.45 ± 0.07 ab	10.70 ± 0.91 bc	0.17 ± 0.01 b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	F7 12/14	14.16 ± 0.59 a	1.21 ± 0.16 ab	10.68 ± 0.07 bc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	F7 07/15	15.27 ± 0.04 a	1.33 ± 1.89 ab	9.19 ± 0.44 bc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12 ± 0.17 ab
	F9 12/14	16.62 ± 2.75 a	1.46 ± 0.15 ab	19.22 ± 5.90 abc	n.d.	n.d.	0.18 ± 0.03 a	n.d.	0.16 ± 0.04 ab
	F14 12/14	17.19 ± 0.99 a	1.31 ± 0.07 ab	16.49 ± 5.09 abc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.26 ± 0.10 ab
	F14 03/15	16.51 ± 0.62 a	2.23 ± 0.18 ab	19.35 ± 14.16 abc	0.15 ± 0.22 b	n.d.	n.d.	n.d.	0.34 ± 0.38 ab
	F14 11/15	16.59 ± 1.46 a	1.41 ± 0.03 ab	13.87 ± 3.57 bc	0.12 ± 0.17 b	n.d.	n.d.	n.d.	0.03 ± 0.04 b
	F20 11/15	15.01 ± 0.70 a	1.04 ± 0.06 ab	13.97 ± 0.22 bc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	F21 12/14	17.47 ± 1.61 a	1.85 ± 0.00 ab	20.25 ± 4.59 abc	n.d.	n.d.	n.d.	0.23 ± 0.14 abcd	0.22 ± 0.05 ab
	F21 11/15	17.50 ± 1.94 a	1.20 ± 0.08 ab	21.17 ± 7.35 abc	0.11 ± 0.15 b	n.d.	n.d.	0.16 ± 0.04 bcd	0.11 ± 0.02 ab
	F21 03/15	17.86 ± 1.06 a	2.06 ± 0.00 ab	16.59 ± 3.78 abc	0.06 ± 0.03 b	n.d.	n.d.	0.22 ± 0.15 bcd	0.14 ± 0.03 ab
	F28 12/14	14.60 ± 0.70 a	1.69 ± 0.00 ab	13.97 ± 1.53 bc	n.d.	n.d.	n.d.	0.03 ± 0.02 cd	0.19 ± 0.00 ab
	F33 03/15	16.62 ± 0.62 a	1.57 ± 0.03 ab	7.62 ± 0.07 bc	0.06 ± 0.09 b	n.d.	n.d.	0.04 ± 0.06 cd	0.02 ± 0.03 b
	F33 12/15	15.04 ± 0.66 a	1.18 ± 1.68 ab	16.70 ± 0.87 abc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	F42 03/15	15.74 ± 1.65 a	1.25 ± 0.21 ab	16.39 ± 4.80 abc	0.08 ± 0.08 b	n.d.	n.d.	0.10 ± 0.10 bcd	0.06 ± 0.00 ab
	F44 03/15	16.49 ± 0.37 a	1.19 ± 0.06 ab	14.54 ± 2.18 bc	0.03 ± 0.04 b	n.d.	n.d.	0.29 ± 0.03 abc	n.d.
	ICS95 12/14	18.20 ± 2.05 a	1.89 ± 0.07 ab	21.38 ± 3.57 abc	0.24 ± 0.14 b	0.07 ± 0.03 a	0.13 ± 0.00 a	0.22 ± 0.01 bcd	0.12 ± 0.09 ab
	ICS 95 06/15	14.29 ± 0.18 a	2.19 ± 0.00 ab	10.84 ± 0.44 bc	n.d.	n.d.	n.d.	0.05 ± 0.08 bcd	n.d.
	INI 1 03/15	15.76 ± 3.74 a	0.55 ± 0.77 b	34.97 ± 8.81 a	n.d.	0.07 ± 0.10 a	n.d.	0.30 ± 0.07 ab	0.08 ± 0.12 ab
	INI 2 03/15	14.99 ± 0.81 a	1.97 ± 0.07 ab	12.37 ± 0.44 bc	0.02 ± 0.03 b	n.d.	n.d.	n.d.	0.08 ± 0.11 ab
	INI 8 03/15	16.93 ± 0.04 a	3.33 ± 0.14 a	18.03 ± 3.49 abc	0.88 ± 0.38 a	0.21 ± 0.30 a	0.25 ± 0.35 a	0.47 ± 0.13 a	0.46 ± 0.07 a

PA 169 06/15	14.93 ± 0.73 a	0.99 ± 1.40 ab	4.40 ± 6.22 c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.09 ± 0.13 ab
SIAL 22	14.86 ± 0.40a a	2.42 ± 0.03 ab	26.68 ± 0.73 ab	0.11 ± 0.03 b	0.03 ± 0.04 a	n.d. b	0.04 ± 0.01 cd	n.d.
SPA 9 06/15	15.19 ± 1.68 a	0.99 ± 0.05 ab	20.30 ± 5.24 abc	0.16 ± 0.05 b	n.d.	n.d.	0.19 ± 0.08 bcd	n.d.
UF273 05/15	16.90 ± 1.98 a	2.42 ± 0.03 ab	15.41 ± 0.22 abc	0.24 ± 0.02 b	0.02 ± 0.03 a	n.d.	0.21 ± 0.08 bcd	0.15 ± 0.09 ab

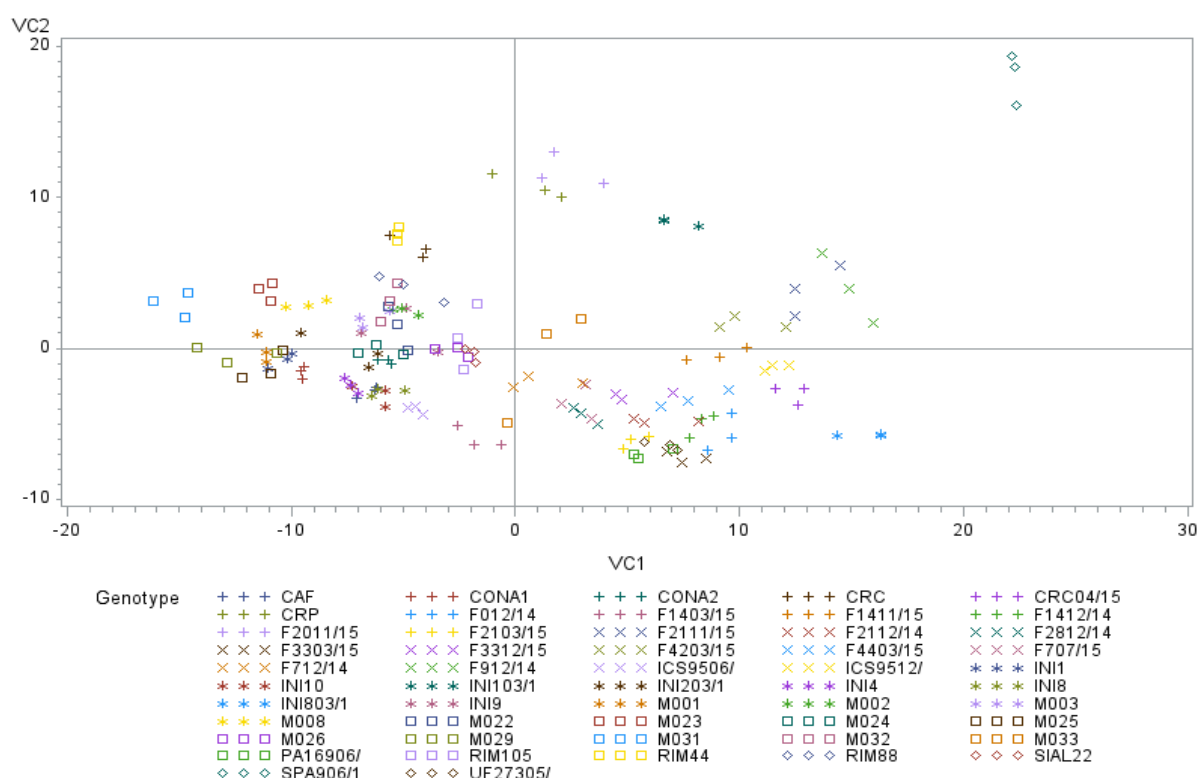
*Standard deviations (n=3). n.d. not determined. Means with the same letter between lines are not significantly different. $\alpha = 0.05$

Canonical discriminant analyses

Discriminant canonical analysis is a multivariate statistical technique whose purpose is to analyze if there are significant differences between groups of objects with respect to a measured set of variables. The analysis permits the systematic classification of new observations of unknown origin in one of the analyzed groups, if they exist. A discriminant analysis was applied in order to compare the husks of the 52 harvested cocoa genotypes. The variables analyzed were antioxidant activity (DPPH) and the content of total phenols, total sugars, theobromine, catechin, epicatechin, epicatechin derivative I, epicatechin derivative II, epicatechin derivative III, epicatechin derivative IV, and epigallocatechin. In this analysis, a maximum of 11 canonical variables (CV) were generated. The first three canonical variables explained the greatest amount of total variability among treatments. CV1 explains for 47.7 %, CV2 explains for 16.6 %, and CV3 explains for 13.6 % of variability. Together, the three canonical variables account for a total of 78% of the variability among the genotypes.

As show in Figure 2, canonical variable 1 (CV1) is mainly influenced by total phenols, theobromine, and total sugars because they have the highest standardized canonical coefficients; whereas CV2 is mainly influenced by total sugars and CV3 by theobromine and DPPH.

The genotypes in the upper right quadrant are those with the highest CBH total sugar content (SPA 9 06/15, F20 11/15, INI 1 03/15, F9 12/14, CRP, and M033). The genotypes located in the upper and lower left quadrants correspond to genotypes for which CBH has the lowest antioxidant activity (CRC, CONA 1, INI 4, INI 8, INI 10, M008, M023, M031, F14 03/15, F33 12/15 RIM 44, and RIM 88). The genotypes in the lower right quadrant correspond to those CBHs with the highest total phenol content (CRC 04/15, F0 12/14, F21 12/14, F21 03715, F28 12/14, F33 12/15, INI 8 03/15, ICS 95 12/14, and PA 169 06/15).



Pooled Within-Class Standardized Canonical Coefficients

Variable	Total phenols	Total sugars	DPPH (EC50)	Theobromine	Catechin	Epicatechin	Derivative I	Derivative II	Derivative III	Derivative IV	Epigallocatechin
CV1	0.7856	0.5279	-0.4107	0.8003	-0.2105	-0.4352	0.1718	-0.0838	0.3375	-0.2601	-0.0430
CV2	0.7856	0.5279	-0.4107	0.8003	-0.2105	-0.4352	0.1718	-0.0838	0.3375	-0.2601	-0.0430
CV3	-0.0204	0.0270	0.6274	0.6664	-0.0406	-0.6436	-0.4108	-0.4917	0.0233	-0.2903	0.2319

Figure 2. Canonical discriminant classification of two canonical variables for the 52 samples studied.

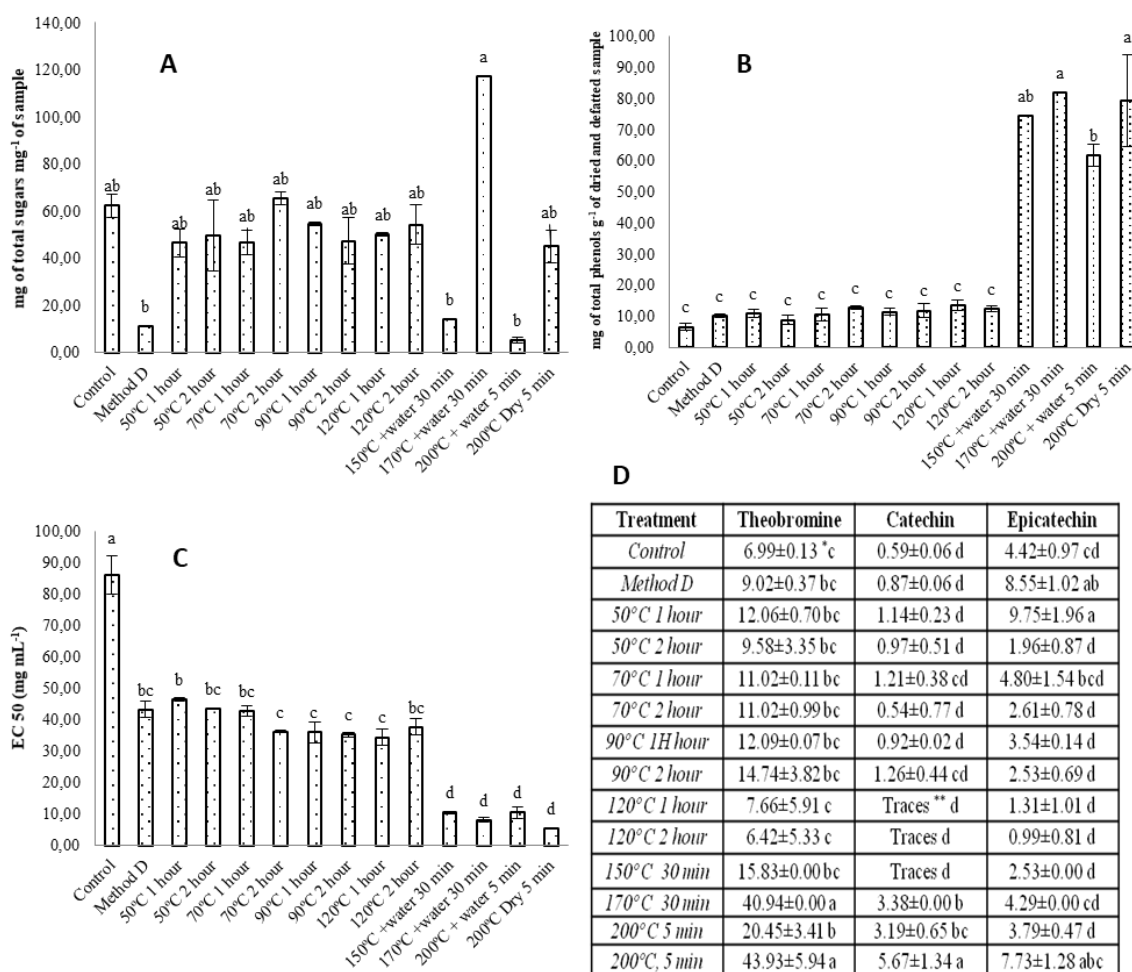
Extraction of bioactive compounds by hydrothermal treatments.

In order to recover a greater amount of bioactive compounds in a cheaper and more effective way, CBH was submitted to different hydrothermal pretreatment conditions with a range of temperatures from 50 °C to 200 °C. Hydrothermal treatments at 150 °C, 170 °C, and 200 °C were carried out in an industrial steam reactor used for the extraction of phenolic compounds from olive oil waste.¹⁹ Results from the hydrothermal treatments were compared with those of solvent extraction (Method D) and a control extraction using water. Higher amounts of total phenols were recovered from CBH by hydrothermal treatments of 150 °C, 170 °C, and 200 °C as compared to Method D and control (Figure 3). Overall, the amount of total phenols increased significantly with higher temperatures, probably because hydrothermal treatment solubilizes a greater

amount of phenols.²⁹ The largest amount of total phenols (82.11 mg g⁻¹ sample) was obtained in the treatment performed at 170 °C for a reaction time of 30 minutes, followed very closely by the treatment at 200 °C for a reaction time of five minutes, in which 79.37 mg g⁻¹ was recovered without significant difference between the two treatments. A previous experiment with dates that compared two hydrothermal treatments at 140 °C and 160 °C showed that treatment at 140 °C extracted the largest amount of total phenols for other agricultural waste. This is probably because the more severe treatment solubilized a greater portion of the cell wall material, mainly hemicelluloses, which may be linked to simple phenols.¹⁸ The treatment at 170 °C and 30 minutes produced an extract with an EC₅₀ of 8.18 mg mL⁻¹, yielding the extract with the second highest antioxidant power, only surpassed by treatment at 200 °C during 5 minutes, which produced an extract with an EC₅₀ of 5.58 mg mL⁻¹ (Figure 3B), without a significant difference between the two treatments. The highest total sugars were recovered in the treatment at 170 °C with water for 30 minutes (Figure 3C).

A high negative correlation, as determined by the Pearson Correlation test (-0.81), was again observed between total phenol content and the EC₅₀ as an inverse measure of the antioxidant activity, and no clear correlation was found neither between the phenolic content and total sugar content nor between the antioxidant activity and total sugar content. These results agreed with those of other studies carried out with cocoa, in which the EC₅₀ was strongly correlated with total phenol and flavonoid contents.^{26,30,31}

The effect of hydrothermal treatments at different temperatures on the HPLC profile of cocoa bean husk is shown in Figure 3D. The highest content of theobromine was found in the extract obtained from treatment at 200 °C for 5 min and 170 °C + water for 30 min treatment, yielding 43.93 mg g⁻¹ and 40.94 mg g⁻¹, six-fold higher than the theobromine content obtained with the control treatment. The 200 °C for 5 min and 170 °C for 30 min treatments also yielded extracts with the highest amount of catechin (5.67 mg g⁻¹ and 3.38 mg g⁻¹, respectively). Epicatechin content ranged from 0.99 to 9.75 mg g⁻¹, yet only thermal treatment at 50 °C yielded significantly higher epicatechin content than the control.



Standard deviations (n=3); **traces: values detected ≤0.01mg g⁻¹ of sample. Means with the same letter are not significantly different. α =0.05. Total phenols are expressed as gallic acid equivalents.

Figure 3. Effect of several hydrothermal treatments on total sugars (A), total and individual phenols (B and D, respectively) and antioxidant activity (DPPH) (C) of CBH extracts.

Mass balance of the extraction of bioactive compounds at 170 °C for 30 minutes.

The treatment at 170 °C for 30 minutes was selected because it led to high solubilization of the desired compounds from CBH and because the treatment is easy to scale up for industrial use. In fact, these are the conditions currently used by industry to revalorize the olive oil by-product pomace.³²

The amounts of phenols, sugars, and theobromine recovered from 100 kg of cocoa bean husk are shown in Figure 4. From 100 kg of CBH, 29.35 kg of crude extract was obtained that was rich in phenols (5.5%), sugars (22%), and theobromine (5.6%). From this extract, it is easy to purify the bioactive components (or use the extract directly) for application in the food, cosmetic or pharmaceutical fields. This extraction method is completely natural, without the addition of any solvent or chemical, obtaining in this way a final inexpensive product that can be used in both organic and conventional products in the case of the food industry.

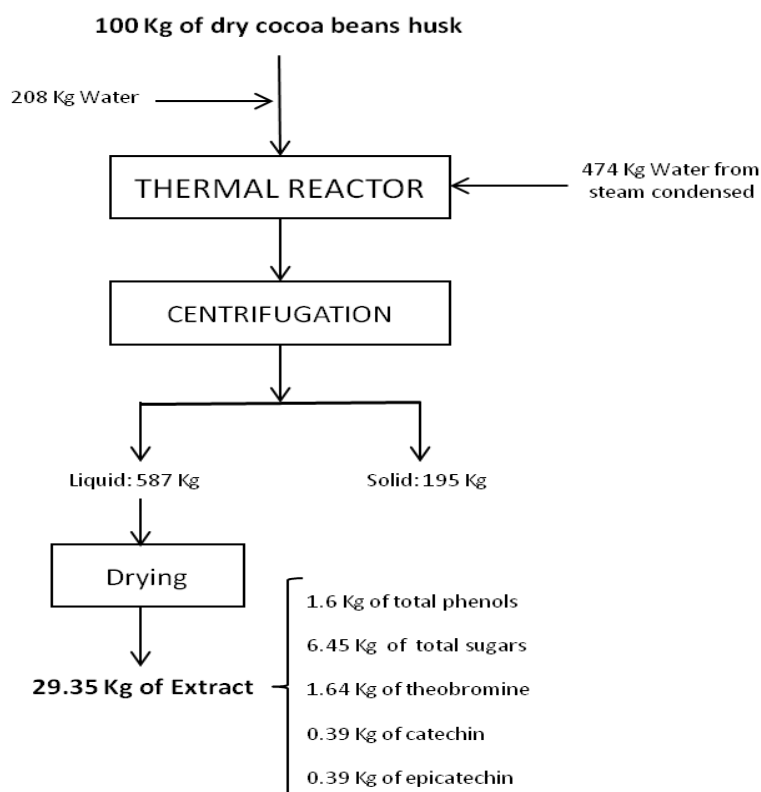


Figure 4. Mass balance of extraction of bioactive compounds from thermally treated CBH (170 °C for 5 minutes).

CONCLUSION

The characterization of CBH from different Mexican genotypes confirmed the presence of bioactive compounds that could be obtained to revalorize this cacao by-product. Phenolic extraction using 80 % methanol or ethanol-acetone mixture at pH 3 were the most effective methods for the analytical characterization of the phenolic content of CBH. The significant differences between genotypes in terms of total and individual phenols, sugars, and antioxidant activity should help to promote the industrial use of the best genotypes, also taking into account the genotypes' agronomical issues.

Hydrothermal treatments over 150 °C increased the bioactive compounds' solubilization and the antioxidant activity of the liquid phase. Treatment of 170 °C with water for 30 minutes was the most effective condition for extracting both phenolic compounds and sugars from the CBH. However, 200 °C for 5 minutes was the best treatment in order to extract theobromine and catechin. Thus, the application of this industrial treatment can help to revalorize the CBH with the extraction of bioactive compounds, as well as providing a rich source of sugar and fiber for human or animal food.

Epicatechin, theobromine, and catechin were the main bioactive compounds found in CBH. The application of thermal treatment permitted the natural solvent-free extraction of bioactive compounds with antioxidant properties for the valorization of CBH and their use in the food, cosmetic or nutraceutical industries.

Further studies are necessary to establish the biological potential of the phenolic and sugar content of CBH and determine other interesting components in order to maximize the use of this by-product. It also important to characterize and identify the biologically active oligosaccharides formed by the thermal treatment of CBH or initially present in the raw material, as well as the activity of the fiber concentrated in the final solid.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and co-funded by a European Social Fund (ESF) (project AGL2016-79088R), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Ramon y Cajal Programme: (RyC 2012-10456), and the Mexican *National* Council of Science and Technology (CONACYT-Mexico).

REFERENCES

1. Arlorio M, Coisson J, Travaglia F, Varsaldi F, Miglio G, Lombardi G, and Martelli A. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂, *Food Research International* **38**:1009-1014 (2005).
2. Mendes FAT and Lima EL. Perfil Agroindustrial do Processamento de Amendoas de Cacau em Pequena Escala no Estado do Pará. Belém, PA: SEBRAE (2007).
3. Hernández-Hernández C, Viera-Alcaide I, Morales-Sillero A, Fernandez-Bolaños J, and Rodríguez-Gutiérrez G. Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk, *Food Chemistry* **240**: 831-839 (2017).
4. Martín-Cabrejas MA, Valiente C, Esteban RM, Mollá E, and Waldron K. Cocoa hull: a potential source of dietary fibre, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **66**:307-311 (1994).
5. Okiyama DC, Navarro SL, and Rodrigues CE. Review: Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry, *Trends in Food Science & Technology* **63**:103-112 (2017).
6. Nazaruddin R, Seng L, Hassan O, and Said M. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation, *Industrial Crops & Products* **2**: 487-494 (2006).
7. Plaza-Recobert M, Trautwein G, Pérez-Cadenas M and Alcañiz-Monge J. Preparation of binderless activated carbon monoliths from cocoa bean husk, *Microporous and Mesoporous Materials* **243**:28-38 (2017).
8. Magistrelli D, Zanchi R, Malagutti L, Galassi G, Canzi E and Rosi F. Effects of cocoa husk feeding on the composition of swine intestinal microbiota, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:2046-2052 (2016).
9. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura M, Sobue S and Matsumoto M. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments, *Archives of Oral Biology* **45**:639-645 (2000).
10. Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M and Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: Their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities, *Journal of Dental Research* **80**: 2000-2004 (2001).

11. Kim KH, Lee KW, Kim DY, Park HH, Kwon IB and Lee HJ. Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk, *Process Biochemistry* **39**:2043-2046 (2004).
12. Matsumoto M, Tsuji M, Okuda J, Sasaki H, Nakano K, Osawa K, Ooshima T. Inhibitory effects of cacao bean husk extract on plaque formation in vitro and in vivo, *European Journal of Oral Sciences* **112**:249-252 (2004).
13. Babu VN, Vivek D and Ambika G. Comparative evaluation of chlorhexidine mouthrinse versus cacao bean husk extract mouthrinse as antimicrobial agents in children, *European Archives of Paediatric Dentistry* **5**:245-249 (2011).
14. Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T and Yoshida T. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**: 2581–2587 (2000).
15. Kopp GM and Bradbury AG. Polyphenol-enriched composition from cocoa shell extraction, US Patent Application (2006).
16. Mrabet A, García-Borrego A, Jiménez-Araujo A, Fernández-Bolaños J, Sindic M and Rodríguez-Gutiérrez G. Phenolic extracts obtained from thermally treated secondary varieties of dates: Antimicrobial and antioxidant properties, *LWT - Food Science and Technology* **79**: 416-422 (2017).
17. Rubio-Senent F, Rodríguez-Gutiérrez G, Lama-Muñoz A and Fernández-Bolaños J. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil by-product alperujo and their antioxidative activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 1175-1186 (2012).
18. Singleton VL and Rossi JJA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**:144-158 (1965).
19. Witham FH, Blaydes DF and Devlin RM, in *Experiment in Plant Physiology*, ed. By Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY, pp. 245 (1971).
20. Azizah AH, Nik Ruslawati NM and Swee Tee T. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products, *Food Chemistry* **64**:199-202 (1999).
21. Wollgast J and Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, *Food Research International* **33**:423-447 (2000).
22. Manzano P, Hernandez J, Quijano-Aviles M, Barragan A, Choez-Guaranda I, Viteri, R, and Valle, O. Polyphenols extracted from *Theobroma cacao* waste

- and its utility as antioxidant, *Emirates Journal of Food and Agriculture* **1**:45-50 (2017).
23. Martínez R, Torres P, Meneses M, Figueroa J, Pérez-Álvarez J and Viuda-Martos M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products, *Food Research International* **49**:39-45 (2012).
 24. Timbie D, Sechrist L, and Keeney P. Application of high-pressure liquid chromatography to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans, *Journal of Food Science* **43**:560-565 (1978).
 25. Biehl B, Passern U and Passern D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **28**:41-52 (1977).
 26. Lee K, Kim Y, Lee H and Lee C. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 7292-7295 (2003).
 27. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food Chemistry* **97**:654-660 (2006).
 28. Katalinic V, Milos M, Kulisic T and Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, *Food Chemistry* **94**: 550-557 (2006).
 29. Mrabet A, Jiménez-Araujo A, Fernández-Bolaños J, Rubio-Senent F, Lama-Muñoz A, Sindic, M and Rodríguez-Gutiérrez G. Antioxidant phenolic extracts obtained from secondary Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) by hydrothermal treatments, *Food Chemistry* **196**:917-924 (2016).
 30. Ramírez M. B, Cely Niño VH and Ramírez SI. Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas, México. Antioxidant activity of clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.) fine and aromatic grown in the state of Chiapas-México, *Perspectivas en Nutrición Humana* **15**:27-40 (2013).
 31. Gültekin-Özgülven M, Berktaş İ and Özçelik B. Influence of processing conditions on procyanidin profiles and antioxidant capacity of chocolates: Optimization of dark chocolate manufacturing by response surface methodology, *LWT - Food Science and Technology* **66**:252-259 (2016).
 32. Fernández-Bolaños J, Rodríguez G, Lama-Muñoz A and Sánchez, P. Dispositivo y procedimiento para el tratamiento de los subproductos de la

obtención del aceite de oliva, International Patent Number
PCT/ES2011/070583(2011).

