

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PASTA DE CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

CHEMICAL CHARACTERISTICS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CACAO (*Theobroma cacao* L.) CLONES PASTE

Mesa-Engativá, L.¹; López-Báez, O.^{1*}; Ramírez-González, S.¹; Espinosa-Zaragoza, S.²; Hernández-Fuentes, A.³; Rosales-Esquinca, M.⁴

¹Laboratorio de Agrotecnologías, AUDES Cacao-Chocolate, Centro Universidad Empresa, UNACH. Campus C. U. km 8 carretera Terán-Emiliano Zapata. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

²Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV, UNACH. Entronque Carretera Costera y Estación Huehuetán, Chiapas, México. ³Instituto de Ciencias Agropecuarias, UAEH. Av. Universidad km 1 Rancho Universitario. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. ⁴Facultad de Ciencias Agronómicas, Campus V, UNACH. Carretera Ocozocoautla Villaflores, Villaflores, Chiapas.

*Autor de correspondencia: olopez@unach.mx

RESUMEN

A lo largo de la historia, el cacao (*Theobroma cacao* L.) se ha caracterizado por ser un alimento con gran valor nutricional, recientes investigaciones han demostrado que el chocolate es fuente alta de antioxidantes que benefician la salud previniendo las enfermedades cardiovasculares. La presente investigación evaluó la importancia de los antioxidantes de 15 pastas de cacao elaboradas con semillas de clones cacao, con base en pH, acidez, sólidos solubles y el contenido de antioxidante procedentes de Tecpatán, Chiapas, México. Se registraron diferencias significativas entre pastas, para el caso de los sólidos solubles (rango de 1.74% a 6.5%), pH de 4.88 a 6.19, acidez desde 0.34% a 0.62% de ácido acético y en la actividad antioxidante se registraron valores de 62.25 a 237.68 mM g⁻¹ en peso fresco de Ácido Ascórbico. La actividad antioxidante se determinó empleando el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) y las pastas que presentaron mayor contenido fueron obtenidas de los clones 246 y 269. Estos resultados permitieron identificar y diferenciar a los clones estudiados, convirtiéndose en un diferenciador de calidad.

Palabras clave: fermentación, secado, chocolate, ABTS.

ABSTRACT

Throughout history, cacao (*Theobroma cacao* L.) has been characterized by being a food with high nutritional value; recent studies have proven that chocolate is a high source of antioxidants that benefit health by preventing cardiovascular diseases. This study evaluated the importance of antioxidants from 15 cacao pastes elaborated with cacao clone seeds, based on pH, acidity, soluble solids, and antioxidant content, from Tecpatán, Chiapas, México. Significant differences were found between pastes, for the case of soluble solids (range of 1.74% to 6.5%), pH of 4.88 to 6.19, acidity from 0.34% to 0.62% of acetic acid, and in the antioxidant activity, values were found of 62.25 to 237.68 mM g⁻¹ in fresh weight of ascorbic acid. The antioxidant activity was determined by using the ABTS method (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and the pastes that presented highest content were obtained from clones 246 and 269. These results allowed identifying and differentiating the clones studied, making them into a differentiator of quality.

Keywords: fermentation, drying, chocolate, ABTS.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 8, agosto, 2017, pp: 72-77.

Recibido: noviembre, 2015. **Aceptado:** junio, 2017.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que tradicionalmente el chocolate ha sido considerado un alimento de bajo valor nutricional, constituye una fuente energética y estudios recientes han demostrado que posee propiedades benéficas para la salud debido entre otros, a su alto contenido de antioxidantes de origen fenólico, lo cual ha generado un interés creciente por el estudio de dichos compuestos aumentando su demanda como productos alimenticios saludables y de impacto en la alimentación humana. Inicialmente, sin fundamento científico, se asoció el consumo de chocolate a efectos benéficos para la salud; aunque en la última década, el cacao y el chocolate ha sido objeto de investigaciones que han aportado evidencias para afirmar que debido a los compuestos que contiene, puede tener efectos benéficos en los procesos asociados con el estrés oxidativo (Wollgast y Anklam, 2000; Gutiérrez, 2002; Hii *et al.*, 2009). Los estudios en humanos tras el consumo de chocolate han mostrado que los flavonoides protegen los tejidos del estrés oxidativo (Gómez-Juaristi *et al.*, 2011) y disminuyen la oxidabilidad de las lipoproteínas de baja densidad y aumentan la capacidad antioxidante del plasma (Devaraj *et al.*, 2002); también se les atribuye una función antioxidante benéfica para la salud, superando en ocasiones a los niveles reportados para el té (*Camellia sinensis* L.) y el vino tinto (Misnawi, 2009; Subhashini *et al.*, 2010). Perea-Villamil *et al.* (2007) determinaron el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de productos derivados del cacao obtenidos bajo diferentes condiciones de procesamiento, encontrando diferencias significativas en el contenido total de polifenoles y actividad antioxidante entre los productos estudiados; el chocolate amargo presentó el mayor contenido de polifenoles y la mayor actividad antioxidante en relación al chocolate con azúcar, chocolate con clavo y canela, de acuerdo con estos autores el cacao se posiciona como un alimento funcional. En otro estudio, Jonfia-Essien *et al.* (2008) compararon una variedad tradicional de cacao con híbridos interclonales de cacao y registraron capacidad antioxidante de $12.4 \pm 7.3 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ para la variedad tradicional y en los híbridos se cuantificó un rango de $21.6 \pm 2.7 \mu\text{mol}$ a $45.5 \pm 2.86 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, encontrando un valor más alto en los materiales híbridos que en el tradicional. Ramírez *et al.* (2013) en un estudio de la actividad antioxidante de clones de cacao finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas, México, encontraron que el grupo que presentó el menor pH de las semillas, resultó ser el de mayor concentración de antioxidantes. Por ello, se determinaron las características físico-químicas y capacidad antioxidante de pastas elaboradas a partir de semillas de 15 genotipos de cacao seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron pastas de cacao (*Theobroma cacao* L.) provenientes de 15 clones selectos de la región de Tecpatán, Chiapas, México, clasificados como árboles agrónicamente productivos por la Agencia Universitaria para el Desarrollo de Cacao (AUDES Cacao-Chocolate) de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH). Frutos maduros de los clones 230, 233, 235, 236, 240, 243, 244, 246, 253, 256, 259, 260, 266, 268 y 269 se recolectaron en los meses de septiembre y octubre del 2013; cuyas semillas en fresco, se sometieron a fermentación en cajones de madera, utilizando la técnica de micro-fermentación por un periodo de seis días. Una vez fermentadas, las semillas fueron

secadas al sol para que alcanzaran un 7% de humedad. Las pastas o licor de cacao se obtuvo luego de tostar los granos secos, eliminarles la testa y fueron procesados en un molino de disco equipado con un motor eléctrico marca siemens de 0.5 HP. Las pastas de cacao se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante tres meses después de su obtención, luego se trasladaron al laboratorio del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ubicado en Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. El análisis se clasificó en físico-químico (pH, acidez, sólidos solubles) y determinados según los métodos establecidos por la AOAC (1995) y la actividad antioxidante por el método de ABTS. El pH se determinó adicionando agua caliente a la muestra de pasta de cacao, según el método 970.21 de la AOAC y usando un potenciómetro digital marca Hanna Instruments pH209. De la misma forma la acidez se determinó siguiendo lo establecido por el método 942.15 de la AOAC, adicionando agua caliente a la muestra de pasta de cacao, se mezcló y se filtró para luego titular con NaOH 0.1N hasta registrar pH de 7.0, aun cuando no se haya presentado un vire a rosado (Stevenson *et al.*, 1993). Los valores de acidez se expresan en porcentaje (%) de ácido acético. Los sólidos solubles de las muestras se determinaron según el método 932.12 de la AOAC, utilizando un refractómetro digital marca Palette PR-101ATAGO; los resultados se expresaron en porcentaje (%). Para el caso de la actividad antioxidante, se empleó el método de ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), que consistió en preparar en vasos de precipitados extractos de las pastas con etanol al 70%, basados en una relación de 0.1



g de pasta en 5 mL de etanol, esta mezcla se tapó y se dejó reposar en refrigeración y a oscuridad por 24 horas. Transcurrido este tiempo, cada extracto se filtró y se utilizaron para la determinación. En una celda de cuarzo se adicionaron 3.9 mL de reactivo ABTS estabilizado y 100 μ L del extracto de cacao. Se realizaron lecturas de absorbancia, en el minuto uno y otra trascurridos siete minutos; estas mediciones se hicieron con un espectrofotómetro marca Thermo Fisher Scientific modelo Genesys 10S VIS calibrado a una longitud de onda de 754 nm. La determinación se realizó en condiciones de oscuridad. Los valores de la actividad antioxidante se expresan en mM de ácido ascórbico en g^{-1} de peso fresco. Se definieron 15 tratamientos (pastas de cacao) correspondientes a cada clon, con tres réplicas para cada determinación. Los datos fueron evaluados usando el paquete estadístico SAS, realizando a cada variable un análisis de varianza y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSION

El Cuadro 1 muestra los porcentajes de sólidos solubles de las pastas, observando que el valor más alto lo registró el clon 266 con 6.5%, la media de la población analizada estuvo en 3.47% y ocho clones (230, 233, 236, 246, 253, 256, 268 y 269) tuvieron valores inferiores a la media poblacional, el resto de las muestras analizadas presentaron valores superiores al valor promedio. El análisis estadístico practicado a los datos detectó diferencias significativas entre las 15 muestras. La importancia de determinar el contenido de sólidos solubles en las pastas de cacao podría ser una medida indirecta del contenido de azúcares presentes en las pastas al asumir el porcentaje de

sólidos solubles expresado en el refractómetro como el contenido de azúcares de sacarosa presentes en la muestra; resaltando que en la búsqueda de material bibliográfico relacionado con esta variable, no se encontraron reportes de investigaciones que permitieran comparar con los resultados obtenidos en esta investigación.

Los resultados del pH de las pastas (Cuadro 1), registraron un rango desde 4.88 para el clon 246 hasta 6.19 para el clon 259. El valor promedio estimado de las muestras fue de 5.72, observando que los clones 246, 230, 233, 235, 269, 256 y 243 registraron valores inferiores de la media, sin embargo, se encontró que ocho clones (266, 244, 236, 240, 253, 259, 260 y el 268) tuvieron valores superiores al promedio. Los valores de pH fueron estadísticamente significativos entre algunos de los 15 clones. En lo referente a la calidad exigida por el mercado y la comercialización de grano de cacao seco, la norma mexicana NMX-FF-103-SCFI-2003 establece que para grano seco y fermentado, debe registrar valores normales que van en un rango de 4.8 a 5.5, con lo que se puede indicar que aquellos que se encuentran por debajo de la media a excepción del clon 243, estarían cumpliendo con lo exigido por la norma. Sin embargo a nivel mundial esos rangos pueden variar dependiendo las exigencias del mercado o la procedencia del mismo; para el caso de Colombia, algunas industrias transformadoras exigen valores de pH de 5.0 a 5.5 (FEDECACAO, 2004), de la misma manera Perea *et al.* (2011) ubicaron ocho clones de 12 analizados dentro del rango de pH medio establecido con valores de 5.3 a 5.6; cumpliendo con los exigidos por la industria colombiana. Lo anterior sugiere que las pastas de cacao analizadas tienen valores de pH normales y aceptados por la industria, reflejándose en el cumplimiento de las normas de calidad. Es de observar también que de acuerdo al rango de la norma mexicana, existen dentro de las muestras analizadas nueve clones que están por encima del límite mayor del rango, y que presentan valores que van de 5.69 a 6.19. Los clones 243, 266, 244, 236, 240, 253, 259, 260 y 268 tuvieron valores superiores de la norma, lo que beneficia a la industria, al estar en un rango más cercano para la estabilización de las pastas en la elaboración de chocolates. De acuerdo a cada investigación y según los valores de pH encontrados, cada autor los clasifica de manera diferente. Para clones provenientes de Chiapas, Ramírez *et al.* (2013) conformaron tres grupos, relacionando el pH con la Acidez y estableciendo; Grupo I: pH 5.5 - 5.9 (Alta acidez), Grupo II: pH 5.9 - 6.3 (Media acidez) y Grupo III: pH 6.3 - 6.7 (baja acidez). Teniendo en cuenta esta clasificación al tratarse de clones provenientes de la misma región, se encontraron dos genotipos (230 y 246) con valores más ácidos a los agrupados por estos autores, siendo el clon 246 el que presenta el valor más bajo de 4.88 e inferior al rango del grupo I (Alta acidez); los demás genotipos se agruparon dentro del grupo II y no se encontraron clones que ingresaran al grupo de baja acidez. Los resultados encontrados en esta investigación en pastas de cacao con semillas fermentadas, difieren de los publicados por Graziani de Fariñas *et al.* (2003) ya que reportan valores de pH de 6.30 a 6.40 en semillas secas sin fermentar. Los reportes de Pérez *et al.* (2002) en granos de cacao fermentados secos y tostados de la región de Chuao son similares a los encontrados en esta investigación ya que presentan valores de pH en rango de 4.81 a 5.55.

Acidez

Los valores de la acidez (Cuadro 1) expresan el porcentaje de ácido acético, cuyos valores oscilaron entre 0.34 y 0.62. El análisis estadístico reportó que hubo diferencia significativa entre las pastas analizadas reportando el valor más alto para el clon 246 y el valor más bajo en el clon 244, el promedio de los valores fue de 0.421 donde se observó que la mayoría de los clones se encuentran en valores que se ubican por debajo de la media correspondientes a los clones, el 269, 243, 233, 235 y 246, presentaron valores por encima de este. El pH al estar relacionado con la acidez, permite identificar que para el clon 246 que presenta menor valor de pH su acidez se ve expresada con el valor más alto de 0.62. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los obtenidos por Perea *et al.* (2011) quienes registran valores de acidez de 0.3% a 0.4% para el grupo. Los valores de acidez de los granos de cacao pueden llegar a variar de acuerdo al procedimiento y al lugar en que se realizan las actividades de fermentación y secado, aunque no existen estudios que confirmen este criterio evidentemente las variedades y el contenido de mucílago presente en las semillas también deben provocar efectos en las variables indicadoras de calidad.

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de las pastas de cacao estudiadas (Cuadro 1) mostró gran variabilidad entre clones, observando que el valor más alto fue obtenido por el clon 269 con 237.68 mM g^{-1} en peso fresco de Ácido Ascórbico y el más bajo para el clon 230 con de 62.25 mM g^{-1} . El análisis de los datos permitió detectar diferencias estadísticas significativas entre las pastas estudiadas. El valor promedio de antioxidantes cuantificado en las pastas resultó en 130.91 mM g^{-1} en peso fresco de Ácido Ascórbico, destacando los clones 230, 256, 235, 253, 236, 243, 244, 266 y 259 cuyos contenidos resultaron inferiores al contenido medio. A diferencia, los clones 260, 240 233, 268, 246 y 269 se ubicaron con valores superiores a la media. Los resultados anteriores se asemejan a los reportados para clones de la misma región por Ramirez *et al.* (2013) donde utiliza el método DPPH y reporta alto contenido de antioxidantes mayor que lo reportado en la literatura de clones procedentes de países asiáticos como Malasia, Ghana y Costa de Marfil, mostrando que existen variedades chiapanecas que poseen un alto contenido de antioxidantes al igual que las analizadas en esta investigación. La determinación y forma de expresar la actividad antioxidante, puede variar según los métodos utilizados, muchos difieren en cuanto a su

mecanismo, sustrato, tiempos de medición y expresión de resultados, sin embargo, todos indican la eficacia de las sustancias que impiden la oxidación de un sustrato bajo condiciones específicas. La mayoría de los métodos utilizados para la determinación de la actividad antioxidante se basan en técnicas de procedimientos comunes, tales como: ABTS, radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), FRAP y DMPD; cada una de ellas puede estar expresada en equivalentes de vitamina C (VCEAC), equivalentes trolox (TEAC); así como lo muestra Kuskoski *et al.* (2005) en la aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, encontrando que entre los métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante, el radical ABTS es uno de los más aplicados, al considerarse un método de más elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable. El tiempo de medida necesario para cada uno de los métodos difiere según el investigador, aunque estudios han demostrado que el tiempo de determinación con el ABTS es de uno y siete minutos, ya que la reacción del radical ABTS no se completa hasta pasado el primer minuto, otros como Re *et al.* (1999) reportan que el tiempo más apropiado para la lectura es de cuatro minutos. Para el caso de cacao, Jonia-Essien *et al.* (2008), compararon una variedad tradicional con híbridos, utilizando el potencial (FRAP) ensayo de reducción férrico antioxidante y Trolox como un estándar, registrando la capacidad antioxidante en $12.4 \pm 7.3 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ para una variedad tradicional y para los híbridos un rango de $21.6 \pm 2.7 \mu\text{mol}$ a $45.5 \pm 2.86 \mu\text{mol TE g}^{-1}$, encontrando un valor más alto en los híbridos que en el tradicional. Azizah *et al.* (2007) realizaron un estudio para determinar la capacidad antioxidante y el contenido de fenólico en cacaos de Malasia, Costa de Marfil, Ghana y Sulawesi, utilizando los métodos de blanqueo de β -caroteno, DPPH y FRAP; usando para cada uno de ellos un extracto acuoso y uno etanólico para cada muestra analizada, encontrando la mayor actividad antioxidante en los extractos etanólicos cuando se determina por el método de DPPH y FRAP. Por el contrario para el método de blanqueo de β -caroteno, la mayor actividad antioxidante se registró en los extractos acuosos. Lo anterior indica que los métodos utilizados para expresar la actividad antioxidante presente en diversos genotipos de cacao son eficientes, bien entendido cada método permite identificar las diferencias significativas en las muestras analizadas. Viluzca *et al.* (2012) reportan un alto contenido de antioxidantes para el chocolate oscuro al 70% de cacao luego de hacer un estudio de la actividad antioxidante en chocolates comerciales venezolanos. La actividad antioxidante

se evaluó por el método de ABTS empleando Trolox como patrón de referencia, encontrando que el mayor contenido lo posee el chocolate oscuro con un valor de $3.95 \pm 2.80 \mu\text{mol}$ Trolox y el menor, los chocolates blancos con un valor de $0.023 \pm 1.62 \mu\text{mol}$ Trolox; aunque se reporten en unidades de medida diferentes a las reportadas en esta investigación, se puede observar que este método permite diferenciar el contenido de antioxidantes en productos de cacao. Para el estudio de los antioxidantes en cacao, se han utilizado diversos métodos lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos; sin embargo, independientemente de la técnica ha sido posible evidenciar diversidad en el contenido de antioxidantes de los materiales estudiados en diversos países. Los resultados de esta investigación utilizando el método de ABTS registraron en la población

de los 15 clones evaluados, identificar material con un alto contenido de antioxidantes para materiales de origen mexicano, que confirma lo reportado por Ramírez *et al.* (2013) utilizando el método de DPPH. Investigaciones previas (Gómez *et al.*, 2011) señalan los efectos benéficos para la salud de los agentes antioxidantes presentes en el cacao y en el chocolate, no obstante se considera necesario investigar los posibles efectos de las actividades de la fermentación, secado y transformación a chocolate a fin de asegurar que el contenido de antioxidantes presentes en las semillas, no se degrade afectándolo de manera negativa.

CONCLUSIONES

Las características fisicoquímicas de las pastas de cacao analizadas reúnen los requerimientos establecidos en la

norma oficial mexicana en cuanto a calidad lo que hace de estos genotipos estudiados, material con potencial para la industria chocolatera. En cuanto a sólidos solubles se cuantificó alto porcentaje en los clones 235, 240, 243, 244, 259, 260 y 266 ya que se ubicaron por encima de la media poblacional, destacando al clon 266 con 6.5% siendo el valor más alto dentro de las muestras. Al asumir esta medida como el contenido de azúcares presentes en las pastas, esta variable se convierte en un parámetro de calidad que podría considerarse benéfico para la industria chocolatera ya que se vería reflejada en disminuir en la adición de azúcares durante la transformación. Considerando el valor del pH, las pastas de cacao de los clones 243, 266, 244, 236, 240, 253, 259, 260 y 268 poseen valores superiores a los establecidos (4.88-5.5) en la norma mexicana, de tal

Cuadro 1. Características fisicoquímicas y actividad antioxidante de 15 pastas de cacao elaboradas con clones de *Theobroma cacao* L., de Tecpatán, Chiapas, México.

Clon	Sólidos Solubles (%)	pH	Acidez (%) Ácido Acético	Actividad antioxidante (mM/g de Ac. Ascórbico)
230	1.9 f	5.45 e	0.40 bcd	62.25 h
233	1.74 f	5.50 e	0.52 ab	164.50 cd
235	4.13 bcd	5.52 e	0.58 a	86.40 gh
236	1.92 f	6.04 ab	0.35 d	106.40 fg
240	3.81 bcde	5.99 ab	0.37 d	148.75 cde
243	5.21 ab	5.69 bcde	0.51 abc	106.64 fg
244	5.32 ab	5.76 bcde	0.34 d	121.98 ef
246	2.67 def	4.88 f	0.62 a	197.43 b
253	2.20 f	6.03 ab	0.39 cd	89.34 gh
256	2.33 ef	5.56 cde	0.41 bcd	68.84 h
259	4.47 bc	6.19 a	0.40 bcd	130.69 ef
260	4.08 bcd	5.93 abcd	0.39 cd	141.28 de
266	6.5 a	5.73 bcde	0.38 d	126.17 ef
268	3.03 cdef	5.96 abc	0.35 d	175.23 bc
269	2.71 def	5.54 de	0.43 bcd	237.68 a
CV	15.18	2.33	9.62	7.84
DMS	1.58	0.40	0.12	30.92

Promedios con la misma letra en la misma columna, no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

forma que se les confiere una calidad superior ya que para la industria están más próximas al valor de pH neutro, característica importante en el proceso de elaboración de chocolates. Existe una relación inversamente proporcional entre el pH y la acidez, lo cual se refleja en el clon 246 cuyo pH es el más bajo (4.88) y presenta la acidez más alta (0.62); valores que aún siguen ratificando la calidad de las pastas al dar cumplimiento de calidad de la norma mexicana. En cuanto a la actividad antioxidante, de las 15 muestras analizadas, las pastas de los clones 269, 246, 268, 233 y 240 presentaron el mayor contenido y por lo tanto mayor potencial para ser aprovechadas en la elaboración de productos de cacao en los cuales el contenido de antioxidantes les confiera un valor agregado.

AGRADECIMIENTOS

A los productores de la Sociedad de Producción Rural-Cacao Tecpateco; al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México; a la Fundación Produce Chiapas y a la Universidad Autónoma de Chiapas, por los apoyos brindados para el desarrollo de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. (16th ed., Vol. 1). Arlington: The Association.
- Azizah O., Amin I., Nawalyah A.G., Ilham A. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*: 1523-1530.
- Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO). 2004. El beneficio y características físico químicas del cacao (*Theobroma cacao* L.). Produmedios. Bogotá, DC – Colombia. (32p.)
- Gómez-Juaristi M., González-Torres L., Bravo L., Vaquero M.P., Bastida S. 2011. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 26(2): 289-292.
- Graziani de Fariñas L., Ortiz de Bertor L., Parra P. 2003. Características químicas de la semilla de diferentes tipos de cacao de la localidad de Cumboto, Aragua. *Agronomía Tropical*, 53(2) 133-144.
- Gutiérrez M.A.B. 2002. Chocolate, Polifenoles y Protección a la Salud. *Acta Farm. Bonaerense* 21 (2): 149-52.
- Hii C.L., Law C.L., Suzannah S., Misnawi M.C. 2009. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2(04): 702-722.
- Jonfia-Essien W.A., West G., Alderson P., Tucker G. 2008. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry*. 108:1155-1159.
- Kuskoski M.E., Asuero A.G., Troncoso A.M., Mancini-Filho J., Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25(4):726-732.
- Secretaría de Economía. 2003. Norma oficial mexicana NMX-FF-103-SCFI-2003. Productos agrícolas no industrializados – cacao en grano (*Theobroma cacao* L) – especificaciones y Métodos de prueba. 43p.
- Perea J.A., Ramirez O.L., Villamizar A.R. 2011. Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9(1):35-42.
- Perea-Villamil J.A.; Cadena-Cala T., Herrera-Ardila J. 2009. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista UIS (Universidad Industrial del Santander, Colombia)* 41(2): 128 – 134.
- Pérez E., Álvarez C., Lares M. 2002. Caracterización física y química de granos de cacao fermentados, secos y tostados de la región de Chuao. *Agronomía Tropical*. 52(2):161-172.
- Ramírez M.B., Cely 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. *Colombia. Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1): 27-40.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26(9/10):1231-1237.
- Stevenson C., Corven J., Villanueva G. 1993. Manual para el análisis de cacao en el laboratorio. Serie Publicaciones Miscelaneas - IICA. Costa Rica. (68p.)
- Subhashini R., Mahadeva Rao U.S., P.Sumathi, Gayathri Gunalan. 2010. A comparative phytochemical analysis of cocoa and green tea. *Indian Journal of Science and Technology* 3(2): 188 – 102.
- Viluzca F., Yee A., Sulbarán B., Berradre M.N. 2012. Actividad antioxidante de chocolates comerciales venezolanos. *Vitae*. 19: S448-S450.
- Wollgast J., Anklaam E. 2000. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, 33, 449-459.