

# Identification and quantification of (+) - Catechins and Procyanidins in Cocoa from Ocumare de la Costa, Venezuela

Eduardo Lujano<sup>a</sup>, Lisbeth Manganiello<sup>\*,b,c</sup>, Ana Contento<sup>d</sup>, Ángel Ríos<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

<sup>b</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

<sup>c</sup>Gerencia de Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación, Centro Nacional de Tecnología Química, Caracas, Venezuela.

<sup>d</sup>Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, Universidad de Castilla la Mancha, Ciudad Real, España.

**Abstract.-** Cocoa has a high polyphenol content, distinguishing the group of flavonoids, within this classification are the flavanols, formed by monomeric species as is the case of the (+)- catechin and its oligomeric forms such as the procyanidin B2 dimer. Due to their antioxidant activity, these substances have therapeutic properties for the treatment of cardiovascular diseases, cancer and other conditions associated with the action of free radicals. The concentration of these compounds can vary depending on their geographical origin and the post-harvest processes. For its identification and quantification, the study analytes of cocoa almonds from Ocumare de la Costa - Venezuela, previously submitted to the roasting process, were extracted. Two extraction cycles were carried out with agitation in different mixtures of organic solvents with acidified water. The extract obtained was evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the calibration range of the method used was [0.10 – 1.00] mg/L from pure standards. The real samples showed maximum values of (11.44 ± 1.74) mg/g of procyanidin B2 and (1.75 ± 0.16) mg/g of (+)- catechin, the results obtained are in agreement with the values reported in the literature.

**Keywords:** cocoa; (+)- catechin; procyanidin B2; antioxidant activity; HPLC

## Identificación y cuantificación de (+) - Catequinas y Procianidinas en cacao procedente de Ocumare de la Costa, Venezuela

**Resumen.-** El cacao presenta un alto contenido polifenoles, distinguiéndose el grupo de los flavonoides, dentro de esta clasificación se encuentran los flavanoles, formado por especies monoméricas como es el caso de la (+)- catequina y sus formas oligoméricas como es el caso del dímero Procianidina B2. Debido a su actividad antioxidante, estas sustancias presentan propiedades terapéuticas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras afecciones asociadas a la acción de radicales libres. La concentración de estos compuestos puede variar dependiendo de su origen geográfico y de los procesos de poscosecha. Para su identificación y cuantificación se procedió a extraer los analitos de estudio de almendras de cacao procedentes de Ocumare de la Costa – Venezuela, sometidas previamente al proceso de tostado. Se realizaron dos ciclos de extracción con agitación en diferentes mezclas de solventes orgánicos con agua acidificada. El extracto obtenido se evaluó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el rango de calibración del método empleado fue de [0,10 – 1,00] mg/L a partir de patrones puros. Las muestras reales arrojaron valores máximos de (11,44 ± 1,74) mg/g de procianidina B2 y (1,75 ± 0,16) mg/g de (+)- catequina, los resultados obtenidos guardan concordancia con los valores reportados en la literatura.

**Palabras clave:** cacao; (+)- catequina; procianidina B2; actividad antioxidante, HPLC.

Recibido: 01 de abril, 2019.

Aceptado: 19 de julio, 2019.

### 1. Introducción

El cacao se viene utilizando con una finalidad curativa desde hace más de dos mil años, desde las antiguas civilizaciones maya y azteca y tras su introducción en Europa en la edad media, se han registrado más de 100 usos medicinales del cacao y el chocolate, entre los que se

\*Autor para correspondencia:

Correo-e: lisbethmanganiello@gmail.com (L. Manganiello)

encuentran tratamientos para el cansancio, la delgadez extrema, la fiebre, la angina y los problemas cardíacos, la anemia, la falta de aliento y los problemas renales e intestinales, entre otros. Gran parte de las propiedades terapéuticas pueden atribuirse a unos compuestos, denominados flavonoides, presentes en grandes cantidades en los granos de cacao.

Los flavonoides constituyen una de las subfamilias de polifenoles naturales a las que la comunidad científica ha dedicado más atención en los últimos años. Sus múltiples propiedades biológicas observadas experimentalmente y su abundancia en la dieta, junto con su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional, los convierten en posibles candidatos a explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar determinadas enfermedades crónicas. La búsqueda de principios activos dentro de los flavonoides tiene, desde el punto de vista farmacológico, algunas ventajas respecto a otros grupos de compuestos naturales. Quizá la más importante es la uniformidad de la configuración química de toda la familia, de modo que las relaciones entre estructura y actividad son más fáciles de establecer. Por otro lado, la disponibilidad de las moléculas flavónicas y la relativa facilidad de su obtención favorecen la evaluación de sus propiedades. A pesar de esto, la mayor parte de la investigación biomédica acerca de los flavonoides se ha venido realizando de forma poco coordinada por laboratorios de distintas áreas de todo el mundo [1].

Álvarez y Orallo [1] indicaron que los resultados experimentales sugieren la posible actividad anticancerígena de diversos compuestos naturales, unido a la estimación de que más del 70% de los cánceres pueden deberse a la dieta, este hecho ha generado un creciente interés en los estudios epidemiológicos que examinan la relación entre los alimentos y la incidencia del cáncer.

Willett [2] resalta que su etiología es multifactorial y se ha descrito que algunos elementos de la alimentación, pueden influir en la probabilidad de su ocurrencia. En este sentido, los antioxidantes han ganado importancia por su posibilidad de

disminuir el riesgo de aparición de la patología. Al respecto, D'Archivio, et al. [3] indican que la ingesta de los polifenoles mediante la dieta han llamado la atención debido a su capacidad para actuar como agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos altamente efectivos. De hecho, se sugiere que son capaces de afectar el proceso general de carcinogénesis, ya sea por limitación de la sobreexpresión de enzimas prooxidantes, por inhibición de genes objetivo implicados en la proliferación celular o por inducir apoptosis. Resulta oportuno acotar que diversos estudios han mostrado que después del consumo de chocolate, tanto el contenido de flavanoles en plasma como la capacidad antioxidante total, aumentan.

Quiñones y colaboradores [4] en su investigación encontraron que los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentaron efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), presentando claros efectos antiinflamatorios, además son capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular.

En su investigación Maskarinec [5] destacó que aunque las procianidinas han sido evaluadas en sistemas experimentales, para una variedad potencial de efectos anticancerígenos que incluyen inhibición de proliferación de células de cáncer de mama, actividad antioxidante local en el tracto gastrointestinal, regulación de las vías de transducción de señales, supresión de oncogenes, inducción de apoptosis, modulación de actividad de enzimas relacionadas con detoxificación, estimulación del sistema inmune, angiogénesis y regulación del metabolismo hormonal, la mayoría de estos mecanismos no han sido investigados en estudios con humanos.

Osakabe en su trabajo indicó que los polifenoles del cacao, catequinas y procianidinas han despertado el interés por su posible efecto sobre la salud cardiovascular [6]. Las catequinas del cacao muestran una alta biodisponibilidad, y aproximadamente el 25-30% de catequinas ingeridas son detectables en la orina. Por otro lado, la ingestión de productos de cacao aumentó el

nivel de HDL. La regulación de HDL mostró un efecto antioxidante. Por lo tanto, los polifenoles del cacao pueden reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Gil [7] estandarizó una metodología analítica HPLC en fase reserva para la determinación simultánea de catequina, epicatequina, cafeína y teobromina en granos de cacao colombianos provenientes de la región santandereana. Durante la etapa de validación, la metodología demostró ser precisa, lineal, reproducible y selectiva frente a los metabolitos primarios presentes en los granos de cacao, especialmente frente a las grasas. Estas características la hacen adecuada y confiable para el objetivo propuesto, permitiendo la cuantificación simultánea de los analitos catequinas, epicatequinas, cafeína y teobromina, solos o en mezcla, en muestras proveniente de todos los estadios de los procesos de preindustrialización del cacao.

Cartaya y Reynaldo [8] mostraron las principales características estructurales de los flavonoides y sus métodos de separación e identificación como la cromatografía líquida de alta resolución. Esta técnica (HPLC) puede ser usada para la separación, determinación cuantitativa e identificación de flavonoides, la cual muestra niveles de resolución y sensibilidad mucho mayor que la cromatografía de papel o de capa fina, por lo que es usada para chequear la homogeneidad de las muestras aisladas por otras técnicas.

Gutiérrez [9] destacó que el chocolate y los productos derivados del cacao se han reconocido como fuentes de compuestos fitoquímicos con potenciales efectos favorables a la salud. El chocolate está entre los alimentos concentrados en polifenoles, particularmente en flavonoides como procianidinas, catequinas y epicatequinas. Un grupo creciente de evidencias sugirió que el consumo regular de los productos del cacao o el uso de sus principios activos como agentes terapéuticos podrían influir favorablemente en la lucha contra las enfermedades cardiovasculares e incluso en otras patologías como el cáncer.

Además cabe destacar que en la última década, el chocolate ha sido objeto de numerosas investigaciones científicas que han aportado evidencia

para afirmar que, por el tipo de grasa y los antioxidantes que contiene, puede ser incluido en una alimentación balanceada sin representar un riesgo para la salud e incluso, puede tener efectos benéficos en los procesos asociados con el estrés oxidativo [10]. Dentro de esta perspectiva, Arlorio *et al.* [11] exponen que en el grupo de polifenoles, se ha identificado a los flavonoides como los principales antioxidantes del cacao y el chocolate oscuro o amargo. El principal grupo de flavonoides presente en el chocolate es el de los flavanoles, el cual comprende estructuras monoméricas como (-)-epicatequina y (+)-catequina, además de sus formas diméricas, oligoméricas y poliméricas, entre las que destacan las procianidinas. Los flavonoides han sido identificados por su capacidad antioxidante y sus posibles implicaciones benéficas en la salud humana. A la luz de los antecedentes descritos, se destaca la importancia de la identificación y cuantificación de las +(-)catequinas y procianidinas B2 en almendras de cacao provenientes de la región central costera del país, después de haber sido sometidas al proceso de tostado, etapa determinante en la producción del chocolate, mediante la técnica de HPLC, dada su precisión. Esta investigación contribuye en la verificación de la calidad del cacao procedente de esa zona, corroborando la presencia de +(-) catequinas y procianidinas B2, incrementando de esta manera el valor agregado de este importante rubro de exportación.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Reactivos y equipos

#### Reactivos

Procianidina B2, grado de pureza 90 %, Sigma Aldrich (USA), (+)-Catequina hidratada, grado de pureza 98 %, Sigma Aldrich (USA), Acetonitrilo, grado LC-MS, Fisher Scientific (Leicester, Reino Unido), Metanol, grado LC-MS, Fisher Scientific (Leicester, Reino Unido), Agua desionizada – sistema MilliQ®, Waters, Acetona, grado analítico, AppliChem PanReac, (Illinois, USA), Ácido Fórmico al 98 %, LabKem, (Barcelona, España).

## Equipo

Cromatógrafo Líquido modelo Agilent serie 1200, equipado con, Desgasificador modelo G1379B, Bomba cuaternaria modelo G1376A que cuenta con dos pistones conectados a los canales “A” y “B” para los disolventes acuosos y orgánicos respectivamente y un rango de presión de trabajo (0–400) bar, un Micro WPS modelo G1377A con un rango de trabajo de (0–40)  $\mu\text{L}$  equipada con dos bandejas para una capacidad de 54 viales cada una, un horno modelo G1316A y un detector DAD modelo G1315. Para la separación de los analitos se utilizó la Columna analítica: Agilent 5 TC–C18® de dimensiones (250 mm  $\times$  4,6 mm) con relleno de un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .

## 2.2. Muestra

### Procedencia

Materia prima cacao criollo (almendras), provenientes de la comunidad de Cumboto productores de cacao Cumbe, genotipos del tipo 60 y 61. Previamente sometida a los procesos de fermentación y secado en el Central de Beneficio de Ocumare de La Costa.

### Obtención del extracto polifenólico

Se tomaron como muestras de estudio almendras de cacao tostada tratadas a diferentes condiciones de temperatura, tiempo de tostado y la posición del horno en la que fueron sometidas al proceso de tostado en la Escuela de Chocolatería. Se tomó como referencia la optimización del método de extracción de Calderón *et al.* [12], el cual se llevó a cabo de la siguiente manera, las almendras fueron molidas con un mortero de manera uniforme para obtener un mejor contacto con los solventes de extracción, se pesaron (0,5000  $\pm$  0,0001) g. La muestra una vez molida fue homogenizada a temperatura ambiente con (5,0  $\pm$  0,5) mL de una mezcla (50; 50; 0,2) metanol–agua–ácido fórmico. Se agitó la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente y a una velocidad de agitación moderada, luego la mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 4500 rpm a fin de retener la mayor cantidad de sólido posible, posteriormente se separó por gravedad el sobrenadante del sólido.

Los sobrenadantes se añadieron en balones de 50 mL y sobre los residuos se añadieron (5,0  $\pm$  0,5) mL de una mezcla de acetona–agua–ácido acético (70; 30; 0,2) en un vaso de precipitado donde por una hora constante se agitó y se procedió con la centrifugación y separación por gravedad de la misma manera, obteniéndose un segundo sobrenadante que se combinó con el anterior en balones aforados de 50 mL, se llevaron hasta el aforo con una mezcla 50:50 de las dos soluciones extractivas (metanol–agua) y (acetona–agua). Luego de la preparación del extracto, fueron almacenados en una nevera para su posterior análisis cromatográfico, el procedimiento se repitió para cada una de las 5 muestras de cacao analizadas.

## 3. Discusión de resultados

### 3.1. Optimización de variables experimentales

#### Composición de la fase móvil

La fase móvil empleada para la separación de la mezcla de los analitos estudiados se obtuvo a través de un gradiente de concentración aumentando la composición del disolvente orgánico.

La programación del gradiente utilizado se inicia con una composición de fase móvil de 100 % ( $\text{H}_2\text{O}$ : 0,2 % ácido fórmico) durante los dos primeros minutos, a partir de allí comienza a variar la composición de la fase móvil en el tiempo, a razón de 4,44 % Acetonitrilo/min hasta alcanzar una composición final de la fase móvil (80 % acetonitrilo: 20 % agua) para un tiempo total de análisis de 20 minutos.

- *pH de la fase móvil.* La acidificación de la fase móvil, utilizando ácidos como acético, fórmico, y fosfórico, es una estrategia común con el fin de suprimir la ionización de los grupos hidroxilos para favorecer la forma no iónica de los flavonoles. Esto se realiza debido a que la forma molecular, se retiene más favorablemente en fase reversa mejorando la resolución y reproducibilidad de las características de retención [13, 14].
- *Elección del gradiente.* La elección del gradiente se basó en la polaridad que presentan

los compuestos estudiados. La (+)- catequina y procianidina B2 se caracterizan por la presencia de grupos OH en su estructura molecular lo cual les otorga una naturaleza altamente polar, por ese motivo se hace necesario variar la composición de la fase móvil en el tiempo a fin de facilitar la separación de los analitos basándonos en sus distintas afinidades entre la fase móvil y el soporte cromatográfico.

### Longitud de onda de trabajo ( $\lambda$ )

El equipo HPLC modelo Agilent 1200, posee un detector DAD (arreglo de diodos), con el cual se registró el espectro de cada soluto conforme eluye en la columna [15], se seleccionó una longitud de onda de trabajo con la cual se pudiera observar la aparición del espectro para la identificación de los compuestos con una alta sensibilidad a concentraciones bajas, preparadas a partir de los patrones madre de 100 mg/L, siendo así 280 nm la longitud de onda empleada en el estudio con una alta sensibilidad. Otras investigaciones realizadas para la separación de las especies de estudio, demuestran que la longitud de onda empleada en esta investigación es la más conveniente [16, 17, 18].

### Flujo de la fase móvil

La velocidad de flujo es un parámetro que influye en la forma de los picos debido a que es inversamente proporcional a la cantidad de tiempo que el analito queda retenido en la columna analítica, es decir, que al tener un flujo alto, se tiene un tiempo de retención rápido y con un flujo bajo el tiempo de retención es más lento. En el caso de la separación de la mezcla de compuestos (+)- catequina y procianidina B2 se obtuvo con una fase móvil mayormente acuosa con gradiente de elución, lo cual generó una mayor presión en el sistema. Este hecho obliga a trabajar a flujos bajos para contrarrestar la sobre presión, dado que el sistema cromatográfico empleado está diseñado para operar a presiones por debajo de 400 bares, el flujo de trabajo seleccionado fue 0,5 mL/min. Klein [17] en su investigación coincide con el

mismo flujo de fase móvil para la separación de la mezcla de los analitos en estudio.

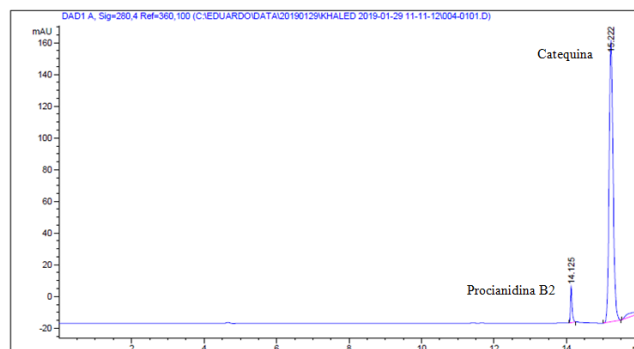


Figura 1: Cromatograma correspondiente a la separación de (+)- catequina y procianidina B2. Fase móvil (100 % H<sub>2</sub>O + 0,2 % ácido fórmico) con gradiente de elución hasta un 80 % de acetonitrilo a razón de 4,44 % de acetonitrilo/min, columna Zorbax Agilent 5 TC, C18, 250×4.6 mm, 5 $\mu$ m, flujo 0,5 mL/min, longitud de onda de trabajo 280 nm, volumen de inyección 20 $\mu$ L y concentración 0,3 mg/L del patrón mezcla de ambos compuestos

### Volumen de inyección

Se tomó como volumen de trabajo 20  $\mu$ L como punto medio del rango de trabajo para este procedimiento experimental. La elección se basó en investigaciones previas que emplearon un sistema de separación similar [16, 18, 15]. La Tabla 1 recoge las condiciones instrumentales optimizadas y el cromatograma obtenido para la separación de (+)- catequina y procianidina B2 se muestra en la Figura 1.

### 3.2. Parámetros de calidad para la validación del método empleado para la separación de (+)- catequina y procianidina B2

A partir de las condiciones de operación establecidas en la Tabla 1, se procedió a la construcción de las curvas de calibración para (+)-catequina y procianidina B2, para ello se prepararon mezclas patrones de las dos especies estudiadas en concentraciones de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 mg/L (ppm) diluidos en agua con 0,2 % de

Tabla 1: Parámetros instrumentales para la separación de la mezcla de (+)- catequina y procianidina B2

Parámetros	Valores				
Flujo de trabajo	0,5 mL/min				
Volumen de inyección	20 $\mu$ L				
Longitud de onda	280 nm				
Columna cromatográfica	Zorbax Agilent 5 TC, C18, 250 $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu$ m				
Solventes para la fase móvil	A		B		
	100 % H <sub>2</sub> O + 0,2 ácido fórmico		100 % acetonitrilo		
Fase móvil (gradiente)	t (min)	0	2	20	30
	% B (adim)	0	0	80	0

Tabla 2: Validación del método propuesto en la determinación de procianidina B2 y (+)- catequina utilizando soluciones patrones

Parámetros globales	Procianidina B2	(+)- Catequina
Ecuación	$y = 27,99x + 72,84$	$y = 2608,13x + 414,86$
R <sup>2</sup>	0,9926	0,9849
Rango de trabajo (mg/L)	0,100 – 1,00	0,100 – 1,00
Desviación de la pendiente ( $S_m$ )	1,39	186,42
Desviación del intercepto ( $S_L$ )	0,84	113,09
Error típico ( $S_{y,x}$ )	0,97	130,23
Límite de detección (mg/L)	0,09	0,13
Límite de cuantificación (mg/L)	0,30	0,43

ácido fórmico. La señal del blanco fue determinada de forma gráfica tomando el intercepto de la ecuación de la recta, teniendo en cuenta que se filtraron cada uno de los patrones de la misma forma que se realizó en el acondicionamiento de las muestras reales, empleando membranas de disco Nylon (0,45  $\mu$ m tamaño de poro, 47 mm de diámetro, Sigma Aldrich). Se inyectaron cada una de las concentraciones de los patrones mencionados anteriormente por duplicado a fin de ahorrar tiempo de análisis y solvente orgánico. Las áreas de pico obtenidas fueron similares para cada concentración de patrón inyectado.

El valor de determinación (R<sup>2</sup>) y la ecuación para cada una de las especies estudiadas, muestran una buena correlación entre las concentraciones de patrones y áreas encontradas para ambos compuestos estudiados. Se procedió con el cálculo de la incertidumbre para, la pendiente e intercepto

de la ecuación de la recta, el error típico y los límites de detección y cuantificación para cada uno de los compuestos, siguiendo el Procedimiento de Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación de Alimentos (LSAIA), para la validación del método del Manual de Calidad interno del laboratorio de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, Ciudad Real, España. La Tabla 2 reporta los parámetros de validación del método correspondientes a cada compuesto.

Basados en los resultados de los parámetros globales que se obtuvieron, se puede resaltar lo siguiente, la ecuación de la recta en el caso de la (+)- catequina, la pendiente fue mayor que la de la procianidina B2, teniendo una mayor sensibilidad a los cambios de concentración que ésta última, con un buen ajuste al modelo de una línea recta con R<sup>2</sup> mayores a 0,98. Además, fue importante

obtener unos límites de detección bajo en el caso de cada compuesto, para obtener la curva a partir de concentraciones bajas de patrón, haciendo así que la cantidad de reactivo que se utilizada sea menor.

### 3.3. Determinación de (+)- catequina y procianidina B2 en muestras reales de cacao tostado

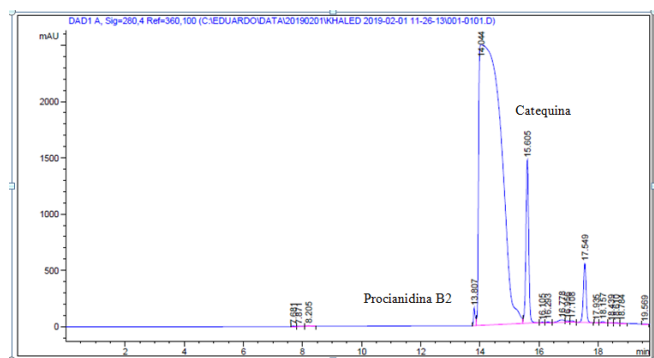


Figura 2: Cromatograma correspondiente al extracto 1 de almendra de cacao tostada a las condiciones: Fase móvil (100 % H<sub>2</sub>O+0,2 % ácido fórmico) con gradiente de elución hasta un 80 % de acetonitrilo a razón de 4,44 % de acetonitrilo/min, columna Zorbax Agilent 5 TC, C18, 250×4.6 mm, 5 μm, flujo 0,5mL/min, longitud de onda de trabajo 280 nm, volumen de inyección 20 μL

Para un total de cinco extractos preparados de muestras de almendras de cacao tostadas cada una tratada a diferentes condiciones de, temperatura, tiempo de tostado y posición de bandeja de horno, con los cromatogramas y las curvas de calibración de cada compuesto, se realizó el cálculo de las concentraciones de (+)- catequina y procianidina B2 en mg/g. La Tabla 3 presenta los resultados, además La Figura 2 muestra el cromatograma obtenido para una muestra real.

Los polifenoles (+)- catequinas y su dímero procianidina B2 se encuentran contenidos en la almendra de cacao tostada proveniente de Ocumare de la Costa, lo cual indica que aunque el cacao esté en condiciones: fresco, seco e incluso después de una etapa de tostado, los analitos determinados por la técnica instrumental propuesta pudieron ser identificados y cuantificados.

### 3.4. Comparación de los resultados obtenidos de (+)- catequina y procianidina B2 respecto a las condiciones del cacao

Las almendras de cacao son ricas en polifenoles (aproximadamente 15 % de peso seco) y alcaloides (hasta 4 %) y éstos contribuyen con el sabor y aroma del cacao. Los polifenoles confieren sensación de amargor y astringencia y contribuyen a los olores a verde y afrutado de las almendras, mientras que los alcaloides confieren amargor y están involucrados en la palatabilidad de los alimentos que los contienen [19].

Además cabe mencionar que Portillo, *et al.* [20] indican que un amplio número de moléculas agrupadas en familias, de las que sobresalen los ésteres, alcoholes y ácidos que habrán de modificarse o aumentar su contenido con los tratamientos posteriores (Tabla 4), pero que desde esta etapa disminuyen la astringencia (disminución de polifenoles totales) y la tonalidad púrpura de las almendras (transformación y degradación de antocianinas), amargor (disminución de alcaloides) de las almendras, desarrollo de coloración marrón (presencia de quinonas). Incluso, algunos parámetros que se emplean a nivel industrial para evaluar el grado de fermentación son los contenidos de antocianinas y el color marrón.

Este efecto se le atribuye a que después de someter la almendra de cacao al tostado se producen compuestos derivados de las reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos, conocidas comúnmente como las reacciones de Maillard o pardeamiento no enzimático [21]. En otros estudios se evidencia que el tostado es la etapa que tiene mayor influencia sobre el contenido de polifenoles totales de almendras de cacao [11].

Al comparar los resultados en el contenido de catequina mostrados en Tabla 3 con los reportados en la Tabla 5 se puede resaltar el efecto de la temperatura y de la condiciones de tostado debido a que en los clones de cacao: CCN51 e ICS 1 aumentó el contenido de catequina con respecto a las muestra que estaba sin tratar, lo cual se asemeja a los resultados de la Tabla 3, en donde la cantidad de catequina en los extractos: E1 y E5 que fueron sometidos a un proceso de tostado en un horno a: 110°C y 120 °C respectivamente,

Tabla 3: Concentraciones de (+)- catequina y procianidina B2 en almendras de cacao tostadas provenientes de Ocumare de la Costa

Extracto	Condiciones de la muestra			Concentración (mg/g)	
	Temperatura(°C)	Tiempo(min)	Posición	Procianidina B2	Catequina
E1	110	150	arriba	9,27 ± 1,54	1,75 ± 0,16
E2	100	120	medio	9,66 ± 0,29	1,52 ± 0,19
E3	120	150	abajo	11,44 ± 1,74	1,63 ± 0,06
E4	100	90	abajo	9,82 ± 1,29	1,59 ± 0,05
E5	120	150	arriba	9,42 ± 0,23	1,66 ± 0,05

Tabla 4: Distribución de las familias de moléculas y número de compuestos volátiles identificados en una muestra típica de cacao

Familias	Cacao fresco	Cacao seco	Cacao tostado
Aldehídos	8	12	11
Alcoholes	15	13	13
Ácidos	14	14	12
Cetonas	9	13	13
Ésteres	22	27	26
Hidrocarburos	3	7	3
Pirazinas	3	7	15
Misceláneos	3	5	3
Pirroles	1	4	4
Furanos	6	7	7
Azufres	1	1	2
Terpenos	3	4	3
<b>Fenoles</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
Oxazoles	0	1	1
Totales	92	121	119

Fuente: Portillo *et al.*[20]

en una posición superior en la cual según Calderón y colaboradores [12] era aquella donde las almendras de cacao eran mayormente tostadas, durante un tiempo de 150 minutos, presentaron la mayor cantidad en el contenido de catequina con (1,66 y 1,75) mg/g respectivamente. En este caso donde todas las muestras fueron tratadas por un proceso de tostado, con la diferencia en posición de bandeja de horno, tiempo de tostado y temperatura de tostado se puede apreciar una diferencia poco significativa en la cantidad de catequina entre un extracto y otro.

Con respecto a las cantidades de catequina obtenidas en la investigación y reportada en la Tabla 3 se presenta un rango de concentración

de (1,52–1,75) mg/g, las cuales son mayores a la cantidad de catequina que se encuentran en los clones de cacao tostado ICS 1, ICS 60, ICS 95, TSH 565 reportados en la Tabla 5, donde solamente el CCN 51 contiene mayor cantidad de catequina que los reportados en este estudio.

#### 4. Conclusiones

La metodología analítica instrumental propuesta permitió la determinación de los polifenoles del tipo flavan-3-ol (+)- catequina y procianidina B2 utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, empleando un detector de arreglo de diodos. El método analítico para la extracción de los polifenoles, necesita de dos ciclos de extracción con mezclas de solventes acuoso-orgánico en medio ácido para asegurar la cuantificación de los compuestos estudiados en las almendras de cacao provenientes de Ocumare de la Costa, sometidas al proceso de tostado. Los límites de detección y cuantificación del método analítico son de 0,13 mg/L y 0,43 mg/L para (+)- catequina, respectivamente y 0,09 mg/L y 0,30 mg/L para procianidina B2, respectivamente.

Las concentraciones de procianidina B2 y (+)-catequina de las muestras reales analizadas, se encuentran en el rango de (9,27 ± 1,54 – 11,44 ± 1,74) mg/g y (1,52 ± 0,19 – 1,75 ± 0,16) mg/g en muestras reales de almendras de cacao sometidas al proceso de tostado, respectivamente. Las concentraciones de (+)- catequina y procianidina B2 en la almendra de cacao tostado utilizadas en esta investigación son altas con respecto a las concentraciones reportadas en la literatura a nivel



Tabla 5: Contenido de metabolitos fenólicos de cinco genotipos de cacao sometidos al proceso de tostado

Clon		Fenoles totales	Taninos condensados	Antocianidinas totales	Catequina	Epicatequina
CCN 51	Sin tratamiento	21,69 ± 0,51	32,61 ± 0,65	0,99 ± 0,01	1,25 ± 0,02	3,31 ± 0,17
	Tostado	20,60 ± 0,32	22,78 ± 0,86	0,82 ± 0,01	3,35 ± 0,05	3,12 ± 0,01
ICS 1	Sin tratamiento	35,36 ± 0,18	6,10 ± 0,66	1,26 ± 0,05	0,22 ± 0,03	10,20 ± 0,47
	Tostado	25,83 ± 0,99	35,76 ± 0,50	0,18 ± 0,01	1,35 ± 0,02	1,04 ± 0,09
ICS 60	Sin tratamiento	37,31 ± 1,79	46,92 ± 1,08	1,01 ± 0,02	0,22 ± 0,02	8,26 ± 0,02
	Tostado	42,79 ± 0,66	56,40 ± 0,89	0,99 ± 0,01	0,02 ± 0,00	2,14 ± 0,02
ICS 90	Sin tratamiento	22,80 ± 0,20	32,09 ± 1,02	0,59 ± 0,02	2,25 ± 0,10	7,26 ± 0,08
	Tostado	21,74 ± 0,18	20,79 ± 0,61	0,17 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,01 ± 0,00
TSH	Sin tratamiento	38,64 ± 1,92	77,24 ± 1,19	1,60 ± 0,02	0,53 ± 0,08	3,14 ± 0,05
	Tostado	41,77 ± 0,83	58,31 ± 1,16	0,40 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00

internacional. Los compuestos (+)- catequina y procianidina B2 determinados en las almendras de cacao sometidas al proceso de tostado, presentan propiedades terapéuticas debido a su actividad antioxidante siendo así importantes en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer de acuerdo con la literatura revisada.

### Reconocimiento

La presente Investigación fue reconocida por la Escuela de Ingeniería Química, de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, Venezuela, con Mención Honorífica por sus aportes en la identificación y cuantificación de compuestos de valioso interés terapéutico como son la (+)-catequinas y Procianidinas B2, presentes en el Cacao Venezolano proveniente de la localidad de Ocumare de la Costa, estado Aragua, Venezuela, confiriéndole a este rubro de exportación alto valor agregado.

### Agradecimientos

E. Lujano y L. Manganiello, agradecen al Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas de la Universidad de Castilla la Mancha, Ciudad Real, España, por todo el apoyo brindado para la realización del presente trabajo, tanto en proveer los patrones puros para la identificación y cuantificación de los compuestos estudiados así como también brindar sus instalaciones y apoyo profesoral para la culminación del mismo.

### 5. Referencias

- [1] E. Álvarez y F. Orallo. Actividad biológica de los flavonoides (I). acción frente al cáncer. *Revista Ámbito Farmacéutico*, 22(10):130–140, 2003.
- [2] W. Willett. *Nutrición en salud y enfermedad*, chapter Dieta, Nutrición y prevención del cáncer, pages 1441–1452. Interamericana MGH, 2002.
- [3] M. D'Archivio, C. Santangelo, B. Scaccocchio, R. Vari, C. Filesi, R. Masella, and C. Giovannini. Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: relevance for cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.*, 9:213–228, 2008.
- [4] M. Quiñones, M. Miguel, y A. Aleixandre. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 27(1):76–89, 2012.
- [5] G. Maskarinec. Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr. Cancer*, 61(5):573–579, 2009.
- [6] N. Osakabe. Cacao polyphenols and atherosclerosis. *J. Clin. Biochem*, 37(3):67–72, 2005.
- [7] J. Gil. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Trabajo de grado en MSc farmacéutica, Escuela de Farmacia, Universidad de Antioquia, Colombia, 2012.
- [8] O. Cartaya y I. Reynaldo. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2):5–14, 2001.
- [9] B. Gutiérrez. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. *Acta Farm. Bonaerense*, 21(2):149–152, 2002.
- [10] M. Posada, V. Pineda, y A. Correal. El chocolate y la salud cardiovascular. *Revista Perspectivas en nutrición humana*, 4:99–111, 2001.
- [11] M. Arlorio, M. Locatelli, F. Travaglia, J.D. Coisson, E.D. Grosso, A. Minassi, G. Appendino, and A. Martelli. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 106:967–975, 2008.
- [12] R. Calderon, Y. Chauran, N. Mendoza, C. Vega,

- J. Rojas, and L. Manganiello. Operating parameters more appropriate in the process of roasted cocoa almonas. *Revista Ingeniería UC*, 23(1):67–80, 2016.
- [13] R. Watson. *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Elsevier Inc, 2014.
- [14] F. Durán. Desarrollo y validación de una metodología analítica para la cuantificación de compuestos flavonoides y organozufrados en aros de cebolla, mediante DLLME–HPLC–UV. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, 2016.
- [15] J. Yépez. Caracterización del contenido de polifenoles: catequina, epicatequina y procianidinas B1, B2 y C1; en cacao CC–51 de las principales zonas productoras del Ecuador. Trabajo de grado, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador, 2017.
- [16] C. Da-Silva, G. Aquino, M. Alves, G. Pereira, D. de Oliveira, M. Bordignon, and M. dos Santos. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP–HPLC/DAD: Method Validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228:106–115, 2017.
- [17] T. Klein, R. Longhini, and J. Palazzo. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC–PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, 88:502–506, 2012.
- [18] Y. Cai, Y. Yu, G. Duan, and Y. Li. Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chemistry*, 127:1872–1877, 2011.
- [19] A. Aprotosoai, S. Luca, and A. Miron. Flavor chemistry of cocoa and cocoa products—an overview. *Food Science and Food Safety*, 15:73–91, 2016.
- [20] E. Portillo, M. Labarca, L. Grazziani, E. Cros, S. Assemat, F. Davrieux, R. Boulanger, y M. Marcano. Formación del aroma del cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) en función del tratamiento poscosecha en Venezuela. *UDO Agrícola*, 9(2):458–468, 2009.
- [21] T. Oliviero, E. Capuano, B. Cammerer, and V. Fogliano. Influence of roasting on the antioxidant activity and HMF formation of a cocoa bean model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1):147–152, 2009.
- [22] S. Zapata, A. Tamayo, y B. Rojano. Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 68(1):7497–7507, 2015.