

El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento

The cocoa and its products as antioxidant source: Processing effect

Janeth Aidé Perea-Villamil¹, Tatiana Cadena-Cala², Jenny Herrera-Ardila²

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de productos derivados del cacao obtenidos bajo diferentes condiciones de procesamiento. **Materiales y métodos:** Las muestras fueron tomadas durante las etapas de procesamiento del chocolate amargo, chocolate de mesa con azúcar, chocolate clavos y canela y un sucedáneo de chocolate obtenido a partir de polvo de cacao y grasa vegetal. El contenido de polifenoles se midió usando el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante fue evaluada sobre los radicales 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6) (ABTS). Adicionalmente se evaluó la habilidad reductora de las muestras sobre el hierro usando el método de FRAP. **Resultados:** Todos los productos estudiados presentaron diferencias significativas en contenido total de polifenoles y actividad antioxidante frente a las diferentes especies radicalarias. El chocolate amargo presentó el mayor contenido de polifenoles y la mayor actividad antioxidante después de las semillas de cacao secas y fermentadas. **Conclusión:** Existe una correlación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, pero estas variables se ven afectadas por el proceso de transformación del grano, especialmente durante la etapa de tostado, en la que se presenta una pérdida de polifenoles y de actividad antioxidante alrededor del 23% con respecto a la materia prima sin tratar. *Salud UIS* 2009; 41: 128-134

Palabras clave: Cacao, polifenóles, actividad antioxidante

ABSTRACT

Objective: To evaluate the content of polyphenols and the antioxidant activity of cocoa products obtained under different processing conditions. **Materials and methods:** The samples were taken during the processing stages of the chocolate with sugar, chocolate with cloves and cinnamon, bitter chocolate and chocolate from cocoa powder and vegetable oil. The content of polyphenols was measured by the Folin-Ciocalteu's method; the antioxidant activity was evaluated on the 2,2-Diphenyl- β -Picrylhydrazyl (DPPH) Radical and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical. Additionally the ferric reducing ability was evaluated using FRAP's method. **Results:** All the products studied showed significant differences in the total phenolic content and the antioxidant activity against various radical

1. Doctora en Química, Magister en Química, Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander.

2. Química, Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander.

Correspondencia: Janeth Aidé Perea Villamil, Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos-CICTA-, Sede UIS Guatiguará, Km. 2 vía Refugio, Piedecuesta, Santander, Tel: 6550804, E-mail: aperea@uis.edu.co.

Recibido: 4 de junio de 2009 - **Aceptado:** 15 julio de 2009

species. The bitter chocolate had the highest polyphenol content and antioxidant activity followed by the fermented and dried cocoa beans. **Conclusion:** There is a linear correlation between the polyphenol content and antioxidant activity, but these variables are affected by grain processing especially during the roasting stage, in which the loss is about 23% compared to the raw material without treatment. *Salud UIS* 2009; 41: 128-134

Keywords: Cocoa, polyphenols, antioxidant activity

INTRODUCCIÓN

El creciente interés en los últimos años por el consumo de alimentos que además de nutrir tengan un impacto favorable en la salud, ha incentivado el estudio de componentes naturales como los polifenoles presentes en plantas y frutos, los cuales han recibido especial atención debido a sus propiedades funcionales como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antitrombóticos, antimutagénicos, antibacteriales y analgésicos¹.

Se ha considerado que alimentos como el vino, las frutas, el té verde y algunas verduras son las principales fuentes de compuestos polifenólicos, sin embargo, en los últimos años diversos autores han demostrado que el cacao y sus productos: licor de cacao, chocolate amargo, polvo de cacao o cocoa, son alimentos ricos en estas sustancias, principalmente en catequinas (epicatequina, epigallocatequina, galocatequina y catequina), además de otros flavonoides como las procianidinas, antocianinas, flavononas y flavonol glicosídicos¹⁻⁶. La concentración de polifenoles en las semillas de cacao secas y libres de grasa oscila entre el 15-20% (p/p) y están constituidos por un 37% de catequinas, un 4% de antocianinas y un 58% de proantocianidinas.

Entre los hallazgos más recientes están los reportados por los investigadores de la Universidad de Harvard⁷, quienes afirman que los indios Kuna de Panamá presentan bajos niveles de enfermedades cardiovasculares, coronarias, cáncer y diabetes, debido al consumo de cuarenta tazas de chocolate semanales.

El tratamiento del grano de cacao durante el proceso de beneficio y su transformación industrial, pueden sin embargo, afectar el contenido de polifenoles y por tanto, la funcionalidad del grano como agente antioxidante. En etapas como la fermentación y el secado, donde se desarrollan los precursores del aroma y sabor, y en el tostado y la alcalinización donde se definen las características organolépticas, se han detectado pérdidas importantes de catequinas y procianidinas^{3, 8 y 9}, por lo cual es necesario conocer las concentraciones en que las sustancias con propiedades funcionales están presentes en los productos que llegan al mercado.

En Colombia el cacao es uno de los principales productos agrícolas ya que constituye una alternativa económica

y sostenible para el desarrollo rural. Adicionalmente el procesamiento del grano de cacao ocupa uno de los principales renglones de la economía¹⁰, siendo el chocolate de mesa el producto derivado del cacao con mayor consumo en el país (0,9 kg /año por persona).

En este trabajo se planteó como objetivo determinar el contenido en polifenoles y la actividad antioxidante de productos derivados del cacao que habitualmente son de consumo masivo, teniendo en cuenta la incidencia de la transformación industrial del grano de cacao.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las muestras se obtuvieron en cada una de las etapas de la línea de producción: a) entrada de la materia prima consistente en semillas de cacao secas y fermentadas (MP), b) tostado de las semillas (T) a 160 °C, c) molienda de las semillas tostadas (Mol) para obtener el licor de cacao, d) maduración (Mad) del licor de cacao para obtener el chocolate amargo (ChA), e) mezclado (Mez) del licor de cacao madurado con: lecitina de soya, azúcar y saborizantes f) atemperado y moldeo para elaborar el chocolate con azúcar (Ch) y el chocolate clavos y canela (C). Adicionalmente se realizaron muestreos de un sucedáneo de chocolate elaborado a partir de polvo de cacao y grasa vegetal (P).

Preparación de los extractos y determinación de polifenoles totales.

Las muestras previamente homogenizadas se desengrasaron con *n*-hexano en baño ultrasónico, y posteriormente se extrajeron sus polifenoles usando etanol/agua 80:20. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos ámbar bajo refrigeración por un tiempo no superior a 5 días¹¹. El contenido de polifenoles totales de los extractos etanólicos se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C), siguiendo el procedimiento descrito por Wollgast¹². El contenido de polifenoles fue expresado como equivalentes de ácido gálico (mg ÁG/g muestra).

Ensayo de potencial antioxidante de reducción del hierro FRAP

La habilidad reductora de las muestras se evaluó mediante el ensayo de FRAP, siguiendo el procedimiento planteado por Benzie y Strain¹³. El cambio en la absorbancia (ΔA_{593}) entre la lectura final después de los 4 min de reacción y la lectura inicial del reactivo, se calculó y se relacionó con ΔA_{593} de las soluciones estándar de Fe^{2+} analizadas simultáneamente. Los resultados se expresaron como μ moles equivalentes de Fe^{2+} /g de muestra en base seca.

Ensayo espectrofotométrico de antioxidantes totales sobre ABTS⁺

El efecto antioxidante de los extractos de cacao y las sustancias patrón sobre el catión radical ABTS⁺, se cuantificó de acuerdo al método reportado por Re y col¹⁴. Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox/kg de muestra en base seca a partir de la curva de calibración realizada con concentraciones entre 0,25 y 2 mM.

Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

El efecto antioxidante de las semillas, de los diferentes chocolates de mesa, y de las sustancias de referencia sobre el radical DPPH, se analizó de acuerdo al método propuesto por Lai¹⁵. El porcentaje de atrapamiento de las muestras sobre el radical DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%SE = \left(1 - \frac{Abs_{Muestra} 517nm}{Abs_{Control} 517nm} \right) * 100$$

Donde el %SE (scavenging effect) es el porcentaje de atrapamiento del radical DPPH.

La concentración efectiva media (EC_{50}) que se define como la cantidad total de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical DPPH en un 50%, se determinó a partir del gráfico de %SE vs la concentración de los extractos o de las sustancias de referencia.

Análisis estadístico

Todos los valores de las mediciones de polifenoles totales por F-C y de actividad antioxidante se sometieron a un tratamiento estadístico y se les aplicó el test de normalidad de Kormogorof-Smirnov, seguido del análisis de varianza ANOVA, para determinar si existen deferencias significativas entre las variables evaluadas; finalmente se usó la prueba a posteriori de Tukey que

permitió establecer las diferencias significativas entre las medias y clasificar los productos en tres grupos: **grupo a** que involucra aquellos que tienen mayor contenido de la variable analizada, **grupo b** con un contenido intermedio y **grupo c y d** que presenta los menores valores. Las diferencias fueron consideradas a un nivel de $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó usando el Software estadístico SPSS 10.0 para WINDOWS.

RESULTADOS

Cuantificación de polifenoles totales

Al aplicar el análisis de varianza Anova a los resultados obtenidos se encontró que existen diferencias significativas entre los productos analizados, procediéndose a aplicar la prueba de Tukey que permitió clasificar los productos en tres grupos (**Figura 1**): grupo **a** con alto contenido de polifenoles en el cual se ubica el chocolate amargo, grupo **b** con un contenido intermedio en el cual se encuentra el chocolate de mesa con azúcar y el chocolate clavos y canela y el grupo **c**, con contenido minoritario, donde se halla el sucedáneo de chocolate fabricado con cocoa y grasa vegetal.

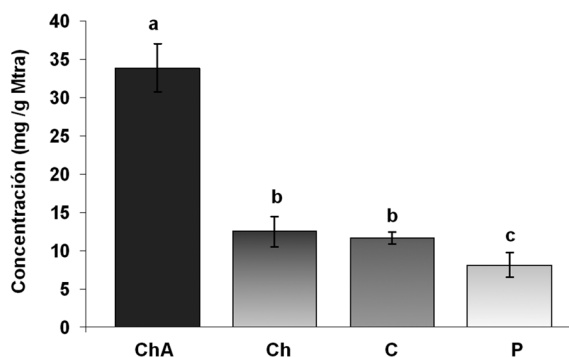


Figura 1. Contenido de Polifenoles Totales de los diferentes chocolates de mesa

*Todos los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar para $n=12$ y para MP $n=20$. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza $P < 0,05$.

El chocolate amargo tiene una concentración de polifenoles tres veces superior ($33,98 \pm 3,13$ mg \dot{A} G/g muestra) a la determinada en el chocolate de mesa con azúcar ($12,56 \pm 1,99$ mg \dot{A} G/g muestra) y el chocolate de mesa clavos y canela ($11,70 \pm 0,75$ mg \dot{A} G/g muestra), y cuatro veces superior a la del sucedáneo de chocolate ($8,11 \pm 1,59$ mg \dot{A} G/g muestra).

De igual forma, durante el procesamiento del grano se observaron diferencias significativas entre las muestras

tomadas en cada etapa (**Figura 2**). La materia prima que entró al proceso (semillas de cacao secas y fermentadas) presentó el mayor contenido de polifenoles (39 mg ÁG/g), el cual disminuyó en un 23% después del tostado. En las etapas de molienda y maduración, la cantidad de polifenoles alcanzó un valor de 34 mg ÁG/g, valor

que nuevamente disminuyó durante el mezclado por la dilución que se presenta al adicionar al licor de cacao ingredientes como azúcar y lecitina. Etapas como el atemperado, el moldeo y el enfriamiento no tuvieron efecto sobre el contenido total de polifenoles.

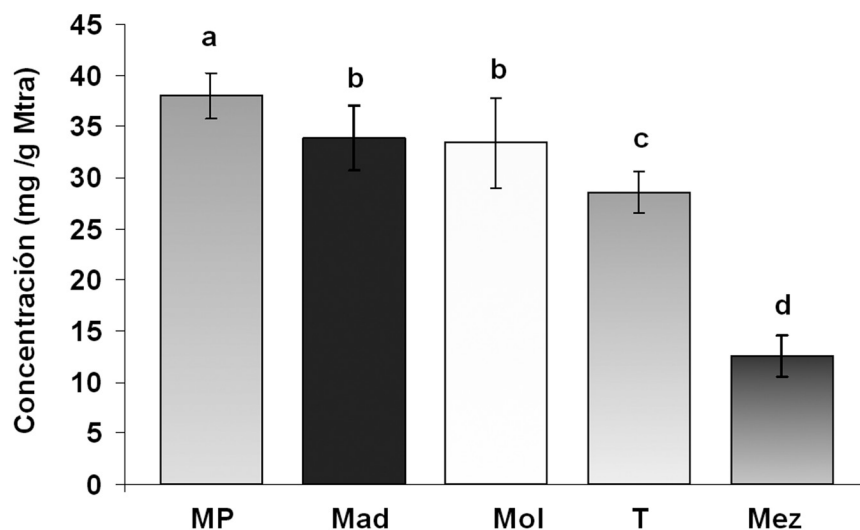


Figura 2. Variación del contenido de polifenoles totales en el proceso de elaboración de chocolate de mesa

*Todos los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar para n=12 y para MP n=20. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza $P < 0,05$.

Actividad antioxidante

El contenido de polifenoles totales está relacionado directamente con la actividad antioxidante de los alimentos que fue medida en el presente estudio, mediante los métodos de FRAP, ABTS y DPPH. En la **Tabla 1** se resumen los resultados obtenidos para los productos derivados del cacao, además de los correspondientes a la actividad antioxidante medida en sustancias patrón como el ácido gálico y el ácido ascórbico.

Tabla 1. Valores de actividad antioxidante medida por los métodos de FRAP y ABTS.

	Muestra	FRAP ($\mu\text{mol Fe(II)/g}$)	ABTS ⁺ (mmol TROLOX/kg)
Proceso	MP	369,96 \pm 54,25 ^a	361,45 \pm 44,68 ^a
	T	261,15 \pm 55,17 ^b	274,40 \pm 37,61 ^b
	Mol	299,69 \pm 33,25 ^b	283,51 \pm 42,64 ^b
	Mad	260,29 \pm 31,79 ^b	270,11 \pm 82,40 ^b
	Mez	104,05 \pm 11,33 ^c	129,70 \pm 27,78 ^c
Productos	ChA	260,29 \pm 31,79 ^a	270,11 \pm 82,40 ^a
	Ch	104,05 \pm 11,33 ^b	129,70 \pm 27,78 ^b
	C	107,96 \pm 7,30 ^b	93,41 \pm 14,81 ^{b,c}
	P	76,15 \pm 1,59 ^c	51,42 \pm 16,57 ^c
Patrones	A.Gálico	16153,37 \pm 110,69	3258,71 \pm 7,3
	A.Ascórbico	8300,19 \pm 258,23	6185,37 \pm 15,2

Todos los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar para n=12 y para MP n=20. Las letras expresan diferencias significativas con un nivel de confianza $P < 0,05$

Ensayo de potencial de reducción del hierro

FRAP

Mediante este ensayo se evaluó la habilidad reductora de los extractos de cacao sobre el complejo de hierro (III). Todos los resultados se expresaron como $\mu\text{mol Fe (II)/g}$. La actividad antioxidante medida por el método FRAP mostró que el chocolate amargo presenta el mayor valor, seguido de los chocolates de mesa con azúcar y clavos y canela, los cuales no presentaron diferencias significativas entre si; el sucedáneo de cacao presentó la menor actividad antioxidante ($100 \mu\text{mol Fe (II)/g}$). En cuanto a las etapas de procesamiento, se observó que todas tienen un efecto significativo sobre la actividad antioxidante del grano, disminuyendo la habilidad reductora del Fe.

Adicionalmente se calcularon los equivalentes de Fe (II) para las sustancias de referencia (Tabla 1) y se compararon con los obtenidos para las muestras de cacao, encontrándose que el ácido gálico ($16153,37 \pm 110,69 \mu\text{mol Fe(II)/g}$) y el ácido ascórbico ($8300,19 \pm 258,23 \mu\text{mol Fe(II)/g}$) poseen una actividad antioxidante muy superior a la de las semillas de cacao secas y fermentadas (MP) y a la del chocolate amargo (ChA), que presentaron valores de $369,96 \pm 54,25 \mu\text{mol Fe(II)/g}$ y $260,29 \pm 11,33 \mu\text{mol Fe(II)/g}$, respectivamente.

Antioxidantes totales sobre le radical ABTS⁺.

Mediante este ensayo se estudió la habilidad de las muestras de cacao para eliminar el catión radical ABTS⁺ presente en el medio de reacción. Se observó que entre los productos evaluados se destaca nuevamente el chocolate amargo con una actividad de $270,11 \text{ mmol Trolox/g}$. Los demás chocolates presentaron valores inferiores que oscilaron entre $129,7$ y $51,42 \text{ mmol Trolox/g}$, siendo el sucedáneo de cacao el que presenta menor eliminación del radical ABTS⁺. En este caso, la actividad antioxidante obtenida para las sustancias de referencia también fue muy superior a la de las muestras de cacao analizadas.

Se encontró además, que el tostado, la molienda y la maduración disminuyen la actividad antioxidante en un 24%, de forma que después del mezclado el valor obtenido fue de $129,70 \text{ mmol Trolox/g}$.

Ensayo de actividad antioxidante sobre el radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

En la **Figura 3** se presenta la variación del %SE con la concentración de los extractos etanólicos de las muestras y se observa que todos los productos tienen un comportamiento cinético similar, presentando un rápido incremento en la actividad antioxidante a concentraciones de $0,5$ a $2,5 \text{ mg/mL}$.

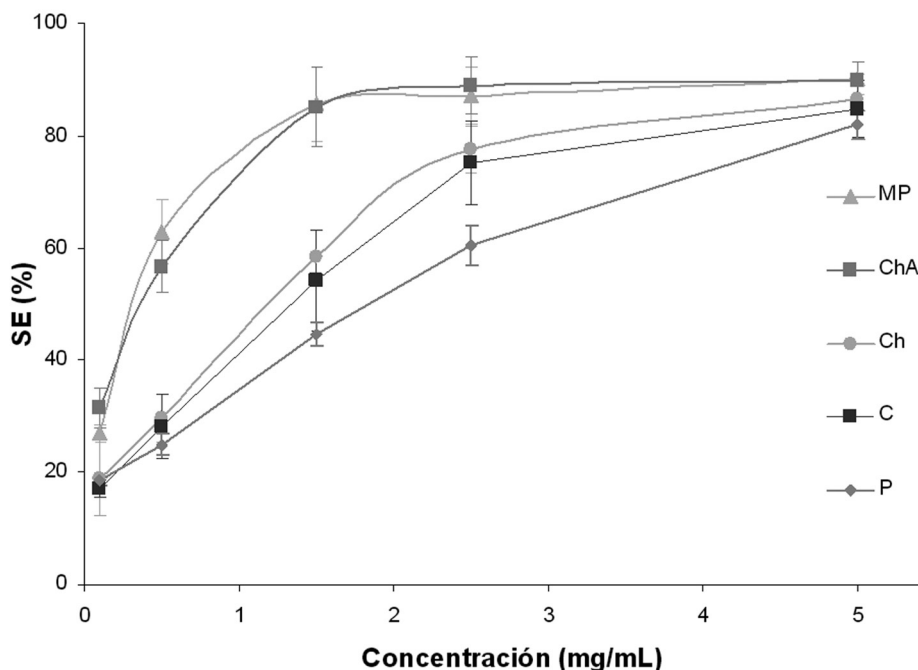


Figura 3. Actividad antioxidante sobre el radical DPPH en cuatro tipos de chocolate de mesa y de las semillas o materias primas. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar para $n = 6$.

A partir de las curvas presentadas en la Figura 3, se determinaron los valores de EC_{50} que se presentan en la **Tabla 2**. En el caso del chocolate amargo, los valores alcanzados muestran que la concentración de extracto necesaria para inhibir en un 50 % la actividad del radical DPPH es 3 veces menor que la requerida con los demás tipos de chocolates de mesa, lo cual se traduce en una mayor actividad antioxidante. Similar comportamiento se observó para las semillas de cacao secas y fermentadas.

Tabla 2. Concentración Efectiva media para las semillas de cacao y los diferentes chocolates de mesa.

Muestra	EC_{50} mg/ml
MP	0,38 ± 0,04
ChA	0,40 ± 0,06
Ch	1,20 ± 0,17
C	1,27 ± 0,20
P	1,85 ± 0,19
A.Gálico	0,027± 0,00
A. Ascórbico	0,07± 0,02

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar para n = 6.

Al establecer una relación entre los valores de actividad antioxidante medidos por los tres métodos utilizados y el contenido de polifenoles de cada una de las muestras, se encontró que existe una correlación positiva entre estas dos variables, lo que demuestra la importancia de los polifenoles en las propiedades funcionales del cacao.

DISCUSION

El consumo de alimentos con alto contenido de antioxidantes como los polifenoles es cada día más trascendente por sus beneficios sobre la salud. En este estudio se encontró que el chocolate amargo presenta un contenido de polifenoles comparable al del té verde (46,46 mg ÁG/g)¹⁶ y superior al de la manzana (3,6-5,3 mg AG/g), la pera (3,3-4,6 mg AG/g) y el kiwi (3,0 mg AG/g)¹⁷, que lo posiciona como un alimento funcional. Los otros productos analizados: chocolate con azúcar, chocolate clavos y canela, y sucedáneo de cacao, a pesar

de presentar menor contenido de polifenoles presentan valores superiores a los reportados para las frutas¹⁷.

Los valores de polifenoles obtenidos para el chocolate amargo fueron superiores a los reportados para diferentes chocolates negros de los Estados Unidos³ (12,30-14,88 mgÁG/g) y similares a los reportados por Vinson y col¹⁸(36,5 mgÁG/g). La cantidad de polifenoles y la actividad antioxidante parecen depender del contenido de sólidos no grasos presentes en los productos finales como lo describe Miller y col³.

La actividad antioxidante del cacao medida por el método FRAP y el método ABTS, mostró diferencias significativas para los productos derivados de cacao y se encontró que la mayor actividad antioxidante la posee el chocolate amargo o licor de cacao puro, en tanto que el chocolate de mesa con azúcar y el chocolate clavos y canela presentaron una actividad antioxidante 2,5 veces menor debido a que estos productos contienen aproximadamente un 30% de licor de cacao. El sucedáneo de chocolate fue el producto con menor actividad antioxidante, debido a que este derivado es fabricado con cocoa y grasa vegetal. En todos los casos la actividad antioxidante fue menor a la de las sustancias de referencia ácido gálico y ácido ascórbico que mostraron valores muy altos (Tabla 1), sin embargo es importante tener en cuenta que estos compuestos son sintéticos mientras que los antioxidantes contenidos en el cacao son de origen natural.

Las diferentes etapas del proceso de manufactura también afectan la actividad antioxidante presente inicialmente en las semillas de cacao secas y fermentadas siendo el tostado la de mayor incidencia debido a las altas temperaturas utilizadas; durante esta etapa la pérdida de actividad antioxidante es del 24% aproximadamente. Algunos autores¹⁹ reportan pérdidas durante los procesos de pretostado (100 °C) y tostado (130 °C), en un rango de 32,6% a 54,7% atribuyendo esta tendencia al efecto de la temperatura y a la posible formación de otros compuestos en la reacción de Maillard.

Finalmente a partir de los resultados obtenidos y según lo reportado en la bibliografía, se puede establecer que comparado con otros alimentos el orden de clasificación en cuanto a contenido de polifenoles totales es: vino tinto > cacao = té verde > manzana > pera > kiwi, lo que permite considerar al cacao y sus productos derivados como buenas fuentes de antioxidantes, resaltando entre ellos el chocolate amargo como derivado del cacao sin azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA por la financiación de esta investigación y a la fábrica de Chocolates Gironés S.A por suministrar las muestras para llevar a cabo este estudio.

APOYOS RECIBIDOS

Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Industrial de Santander: Financiación del proyecto.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses

REFERENCIAS

1. Wollgast J Y Anklam E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufactured of chocolate methodology for identification and quantification. *Food Res Int.* 2000; 33: 423-447.
2. Dreosti IE. Antioxidant Polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutrition.* 2000; 16: 7-8.
3. Miller K, Stuart D, Smith N, Lee C, Mchale N, Flanagan J, et al. Antioxidant Activity and Polyphenol and Procyanidin Contents of Selected Commercially Available Cocoa-Containing and Chocolate Products in the United States. *J Agr Food Chem.* 2006; 54: 4062-4068.
4. Prior R, Wu X Y Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J of Agr Food Chem.* 2005; 53 (10); 4290-4302.
5. Jonfia-Esien W. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chem.* 2008. "En Prensa".
6. Lee KW, Keem YJ, Lee HJ Y Lee CY. Cocoa has more phenolic phitochemicals and higher antioxidant capacity than teas and reed wine. *J Agr Food Chem.* 2003; 51: 7292-7295.
7. Holleberg N, Bayar V, Chamorro F, Motta J. Does Flavanol Intake Influence Mortality from Nitric Oxide-Dependent Processes? Ischemic Heart Disease, Stroke, Diabetes Mellitus, and Cancer in Panama. *Int J Med Sci.* 2007; 4: 53-58.
8. Cros E, Villeneuve F, Vincent JC. Evolution des composés phenoliques du cacao au cours de la fermentation en relation avec la qualité. *9th Conference Internationale sur la Recherche Cacaoyere*, Feb 12-18, 1984, Lome, Togo; Cocoa Producers Alliance: Lagos, Nigeria. 1984; 651-655.
9. Tomas B, Francisco A, Elena CJ, Alicia M, Begoa M, Angel GI, et al. A New Process To Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans. *J Agr Food Chem.* 2007; 55: 3926-3935.
10. DNP - Departamento Nacional de Planeación. Azúcar, confitería y chocolatería. Estudio sobre cadenas productivas: Estructura, comercio internacional y protección. Bogotá D.C. 2004. Disponible: <http://www.dnp.gov.co>
11. Othman A, Ismail A, Ghani N, Adenan I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 2007; 100: 1523-1530.
12. Wollgast J. The contents and effects of polyphenols in chocolate, Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate in human health. Alemania. Trabajo de doctorado. Instituto de ciencias nutricionales. Facultad de Agricultura y ciencias de nutrición, economía y administración ambiental. Universidad de Gieben. 2004
13. Benzie I y Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996; 239: 70-76.
14. Re R., Pellegrini N, Protegente A, Pannala A, Yang M y Rice EC. Antioxidant activity applying and improved radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med.* 1999; 26: 1231-1237.
15. Lai L, Chous S, Chao W. Studies on the antioxidative activities of hsian-tsaio (Mesona procumbens hemsl) leaf gum. *J Agr Food Chem.* 2001; 49: 963-968.
16. Moraes S, Oldoni T, Regitano M y Alencar M. Actividad antioxidante y compuestos fenólicos en infusiones herbarias. *Revista C y TA.* 2008; 6: 57-60.
17. Imeh U y Khokhar S. Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. *J Agr Food Chem.* 2002; 50: 6301-6306.
18. Vinson JA, Proch J y Zubik L. Fenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J Agr Food Chem.* 1999; 47: 4821-4824.
19. Arlorio M, Locatelli M, Travaglia F, Coisson J, Grosso E, Appendino G, et al. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the Antioxidant Activity of cocoa beans. *Food Chem.* 2007; 106: 967-975.