

DEPÓSITO LEGAL ZU2020000153

ISSN 0041-8811

E-ISSN 2665-0428

Revista de la Universidad del Zulia

Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada



Ciencias

Exactas,

Naturales

y de la Salud

Año 14 N° 40

Mayo - Agosto 2023

Tercera Época

Maracaibo-Venezuela

Caracterización y cuantificación espectroscópica de flavonoides y catequinas del cacao venezolano para ser considerados en formulaciones cosméticas

Ruth Monroy *
Fredina Montaña **
Nancy Salinas ***
Ingrid Velásquez ****
Juan Velásquez *****
Euclides Velazco *****
Juan Pereira *****

RESUMEN

Los polifenoles son compuestos que se encuentran en diversas fuentes vegetales, siendo el grupo de los flavonoides el más común de ellos. Dentro de este grupo, las catequinas son de interés en el área cosmética y salud de la piel. Por ello, la investigación se enfocó en la extracción y determinación del contenido de polifenoles, flavonoides y (-)-epicatequinas presentes en cacao proveniente de Canoabo, como potencial agente antienvejecimiento de la piel para ser empleado en la industria cosmética. Se realizó la extracción de los compuestos polifenólicos de la muestra de cacao fermentado y seco empleando un equipo Soxhlet, usando como solvente metanol. La caracterización se llevó a cabo por espectroscopia infrarroja (FTIR), espectroscopia UV-visible, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), microscopia electrónica de barrido (SEM) y tensiómetro de Du Nouy. Empleando FTIR y UV-Visible, se determinó la presencia de flavonoides. El extracto alcohólico del cacao presentó una concentración de polifenoles totales igual a $13.500,56 \pm 0,89$ mg AG/L y la concentración de flavonoides igual a $7.792,2 \pm 0,3$ mg EC/L. A través del HPLC se determinó que la cantidad de (-)-epicatequina resultó $1.434,4 \pm 0,6$ mg EC/kg. A través de la determinación de la tensión superficial a una solución acuosa al 1 % v/v de extracto polifenólico, se evidenció que los polifenoles pueden comportarse como anfífilos. Con los resultados obtenidos se puede garantizar que el extracto contiene los polifenoles necesarios para ser incorporados en una formulación con potencial aplicación cosmética.

PALABRAS CLAVE: Polifenoles, antioxidantes, flaván-3-ol, (-)-epicatequina, HPLC, SEM.

* Laboratorio de Petróleo, Hidrocarburo y Derivados (PHD) de la Universidad de Carabobo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2523-5511>. E-mail: desireemonroy@gmail.com

** Laboratorio de Petróleo, Hidrocarburo y Derivados (PHD) de la Universidad de Carabobo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6452-0521>

*** Laboratorio de Petróleo, Hidrocarburo y Derivados (PHD) de la Universidad de Carabobo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1988-9674>

**** Laboratorio de Petróleo, Hidrocarburo y Derivados (PHD) de la Universidad de Carabobo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5522-0161>

***** Laboratorio de Servicios Analíticos de Empresas Alimentos Polar, Planta Salsas y Untables. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7648-8597>

***** SERVOLAB, Puerto Ordaz, Venezuela. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8240-1411>

***** Laboratorio de Petróleo, Hidrocarburo y Derivados (PHD) de la Universidad de Carabobo. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4600-726X>

Recibido: 14/12/2022

Aceptado: 10/02/2023

Characterization and Spectroscopic Quantification of Flavonoids and Catechins from Venezuelan Cocoa to be Considered in Cosmetic Formulations

ABSTRACT

Polyphenols are compounds found in various plant sources, the most common being the flavonoid group. Within this group, catechins are of interest in the area of cosmetics and skin health. Therefore, the research focused on the extraction and determination of the content of polyphenols, flavonoids and (-)-epicatechin molecules present in cocoa from Canoabo, as a potential antiaging agent for the skin to be used in the cosmetics industry. The extraction of the polyphenolic compounds was carried out from the fermented and dry cocoa sample using a Soxhlet equipment, using methanol as solvent. They were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), UV-visible spectroscopy, high efficiency liquid chromatography (HPLC), scanning electron microscopy (SEM) and Du Nouy tensiometer. Using FTIR and UV-Visible, the presence of flavonoids was determined. The alcoholic extract of cocoa presented a concentration of total polyphenols equal to $13,500.56 \pm 0.89$ mg AG/L, the concentration of flavonoids equal to $7,792.2 \pm 0.3$ mg EC/L. Through HPLC it was determined that the amount of (-)-epicatechin was $1,434.4 \pm 0.6$ mg EC/kg. Through the determination of the surface tension of a 1% v/v aqueous solution of polyphenolic extract, it was evidenced that polyphenols can behave as amphiphiles. With the results obtained, it can be guaranteed that the extract contains the necessary polyphenols to be incorporated into a formulation with potential cosmetic application.

KEY WORDS: Polyphenols, antioxidants, flavan-3-ol, (-)-epicatechin, HPLC, SEM.

Introducción

Los polifenoles son compuestos de baja masa molecular (200-400 g/mol) que se encuentran en plantas, frutas, vegetales, granos y cereales. Se producen como metabolitos secundarios, cuya función es proteger la planta de factores bióticos y abióticos, como la radiación UV y de ciertos agentes patógenos (Gordo, 2018). Los compuestos fenólicos pueden clasificarse según su estructura química, en fenoles simples y polifenoles. Los fenoles simples incluyen los ácidos fenólicos y cumarinas, mientras que los polifenoles incluyen: flavonoides, estilbenos, lignanos y taninos (Valencia-Avilés et al., 2017).

Las semillas de cacao son una rica fuente de polifenoles (aproximadamente el 15 % del peso del grano seco) similares al vino, el té o las verduras, contribuyendo a los sabores del licor de cacao de manera significativa, debido a que aportan la astringencia y amargor (Nazario et al., 2018).

Los flavonoides presentan un esqueleto característico difenilpirano (C6 -C3 -C6') con diferentes patrones de sustitución. Está conformado por dos anillos fenilo (A y B) y entre ellos, un anillo de pirano o pirona heterocíclico (C). Los átomos de carbono se enumeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B (Wang et al., 2018; Dias et al., 2021) (Figura 1).

Los flavonoides se pueden clasificar en varias subclases: flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas y chalconas (Valencia-Avilés et al., 2017; Díaz et al., 2021) (Figura 2).

La estructura polifenólica de los flavonoides, resulta ideal para la actividad secuestrante de radicales libres, además han demostrado ser varias veces más eficaces como antioxidantes que por ejemplo las vitaminas E y C (Valencia-Avilés et al., 2017), empleados convencionalmente como los más potentes antioxidantes naturales. Y, en el cacao se ha demostrado que el contenido de polifenoles y potencial antioxidante es superior a muchas fuentes naturales (Vázquez-Ovando et al., 2016).

En cacao hay 3 grupos principales de polifenoles, dos pertenecen al grupo flavonoides: catequinas (flavan-3-ols) y antocianinas (antocianidinas) y uno, pertenece al grupo de los taninos: las proantocianidinas (taninos condensados). Los monómeros representan del 5 % al 10 % y los polímeros el 90 % del total de los polifenoles del cacao (Nazario et al. 2018; Ordoñez et al. 2019).

El grupo de moléculas llamadas catequinas están conformadas por los monómeros (-)-epicatequina, (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina. Este grupo conforma aproximadamente entre el 29 % al 38 % del total de polifenoles en el cacao. La (-)-epicatequina se encuentra en mayor proporción de las catequinas, cerca del 98 %. (Ortiz et al., 2019; Urbánska et al., 2019; Ramos-Escudero et al., 2021). Las catequinas, contienen un esqueleto de benzopirano con un grupo fenilo unido a la posición 2 y un grupo hidroxilo a la posición 3 (Brglez

et al., 2016). Las moléculas del grupo catequina que se encuentran en el cacao, son principalmente (+)-catequina (C) y (-)-epicatequina (EC) (Coșarcă et al., 2019; Ortiz et al., 2019), sus moléculas se encuentran representadas en la Figura 3.

Las excelentes propiedades antioxidantes de las catequinas, se deben a la presencia de grupos hidroxilo de catecol en el anillo B. La epicatequina y el galato de epicatequina, respectivamente con una estructura de difenol vecina en el anillo B y un anillo C saturado, exhiben los efectos antioxidantes potentes (Ellinger et al., 2020; Ramos-Escudero et al., 2021).

Otro flavonoide presente en el cacao son las antocianinas, las cuales son glucósidos de antocianidinas. Estos glucósidos están compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Está basada en la estructura básica del cromóforo 2-fenil-benzopirilio (Sinopoli et al., 2019)

En el cacao la fracción de antocianina, representa aproximadamente el 4 % de los polifenoles totales (Ortiz et al., 2019). Son las responsables, de los colores rojo, naranja, azul y púrpura de frutas y verduras dependiendo del pH en que se encuentre. Además, participan en los mecanismos de defensa de las plantas contra diferentes factores ambientales. Las antocianinas también son consideradas como flavonoides con alto potencial antioxidante (Condori et al., 2020)

El otro grupo de polifenoles en el cacao son los taninos, el cual está representado por las proantocianidinas. Se encuentran contenidas en las semillas de cacao y están presentes como dímeros, trímeros u oligómeros de flavan-3,4-dioles (representan aproximadamente del 58 % al 65 % del total de polifenoles). Las proantocianidinas poliméricas y oligoméricas, llamadas también taninos condensados (Ortiz et al., 2019; Rauf et al., 2019).

El contenido y la composición de los polifenoles varían dependiendo de varios factores como: genotipo, origen, grado de madurez y procesamiento del grano. Además, el contenido de polifenoles se ve ampliamente influenciado por las condiciones edafo-climáticas, es decir, el ambiente donde se desarrollan los árboles y la altitud a la que se encuentran las plantaciones, debido posiblemente por el diferencial de radiación UV-B, la cual influye de manera directa en la biosíntesis de polifenoles (Vázquez-Ovando et al., 2016; Urbańska et al., 2019).

Otros factores, son el manejo pre y post cosecha, los cuales son prácticas culturales de manejo de la plantación. Comenzando por el tratamiento para controlar enfermedades y plagas, el proceso de fertilización, cosecha, almacenamiento, procesamiento de la mazorca, hasta el proceso final que incluye la fermentación, el secado y tostado de las almendras (Vázquez-Ovando et al., 2016; Urbańska et al., 2019; Alvarado et al., 2020).

El contenido de polifenoles totales, durante el proceso de fermentación se puede reducir hasta un 20 % (Vázquez-Ovando et al., 2016). Sin embargo, el comportamiento puede no ser uniforme durante la fermentación.

El proceso de tostado provoca una reducción del contenido y la composición de los polifenoles totales, debido a las altas temperaturas durante el proceso, debido a que son estructuras moleculares termolábiles. Como consecuencia, podría inducir la epimerización de (-)-epicatequina (el principal flavanol presente en los granos de cacao sin tostar) a (-)-catequina y (+)-catequina a (+)-epicatequina (Urbańska et al., 2019).

Los polifenoles presentes en el cacao, actúan como antioxidantes, con el potencial de inhibir la peroxidación lipídica y para interceptar y neutralizar eficazmente las especies reactivas de oxígeno (ERO o por sus siglas en inglés ROS) (Cherubim et al., 2019). La acción de los polifenoles en la piel, mejora la elasticidad y el tono, tiene efecto antiinflamatorio, antimicrobiano, antialérgico y, fortalece las paredes capilares. Dentro de este grupo, las catequinas han despertado interés en el área cosmética y la salud de la piel, además de presentar un efecto significativo de fotoprotección contra el estrés oxidativo mediado por los rayos UV, el melanoma, el carcinoma basocelular y las quemaduras solares (Lin et al., 2018; Nakano et al., 2018; Adamska-Szewczyk et al., 2019; Cherubim et al., 2019; Bae et al., 2020; Aljuffali et al., 2022). Es por esto que el objetivo de la investigación fue la obtención y caracterización de catequinas presentes en cacao proveniente de Canoabo como potencial agente antienvjecimiento y restaurador de la piel para la industria cosmética.

1. Materiales y métodos

1.1. Materia vegetal

Los granos de cacao (*Theobroma cacao*) de variedad criollo utilizados en este estudio, fueron obtenidos de la hacienda cacaotera San Cayetano, ubicada en Canoabo, al occidente del estado Carabobo-Venezuela. Los granos provenientes de las mazorcas maduras, fueron sometidos al proceso de fermentación durante 5 días, en unos cajones (tipo escalonados) de madera dulce. Este proceso ocurre en el cuarto de fermentación. El proceso de secado, se realizó en el patio de secado en piso de ladrillo (método tradicional de las haciendas cacaoteras), en el cual los granos fueron sometidos al sol (en verano) durante 10 días, de los cuales los primeros 5 días se realizó movimientos al cacao cada 20 minutos y a partir del quinto día se dejaron directamente al sol sin aplicar movimientos.

En el laboratorio, los granos secos y fermentados fueron molidos en un mini procesador de alimentos (Black&Decker eléctrico con función de pulso, modelo HC306b, USA) Se analizaron muestras de cacao fraccionado y cacao molido. Una porción de granos fue fraccionada en el mismo procesador de alimentos, pero empleando la función de pulso sólo por 5 segundos, para evitar la molienda completa de los granos.

1.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de la superficie de 5 gramos de granos de cacao partidos y 5 granos de cacao molido se analizó con un microscopio electrónico de barrido Hitachi, modelo TM4000 Plus II (USA). Las muestras de cacao se fijaron en el porta muestras con pintura de grafito. Se introdujeron en el analizador y se capturaron micrografías electrónicas de cada muestra con un aumento de 500 y 1000x.

1.3. Extracción de compuestos fenólicos del grano de cacao

La extracción sólido-líquido se realizó empleando un equipo Soxhlet durante 5 h, siendo el solvente Metanol (Metanol grado HPLC, Merck), siguiendo el procedimiento de Arlorio et al. (2009). Posteriormente se filtró y eliminó el solvente empleando un rotaevaporador (Yamato Re200 Rotary Evaporator, USA) para obtener así el extracto concentrado, de color vino tinto oscuro. El extracto se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm (Centrífuga digital TD4C, USA), con la finalidad de eliminar los sólidos remanentes, y el sobrenadante fue rotaevaporado hasta sequedad, pesado (balanza Adventurer de Ohaus AR1140, USA) y nuevamente disuelto

con metanol hasta obtener 10 mL de un extracto concentrado. Luego fue conservado en refrigeración a hasta su caracterización.

1.4. Caracterización del extracto alcohólico del cacao por Infrarrojo

El espectro se realizó en el extracto metanólico, empleando un espectrofotómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier FTIR, modelo: Frontier Perkin Elmer (USA).

1.5. Determinación del contenido de polifenoles totales en el extracto alcohólico

Para el análisis se empleó el método descrito por Scotti et al. (2020), en el cual, a 500 µL de extracto se le adicionó 125 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) se agitó y se dejó en reposo por 8 minutos. Se adicionaron 400 µL de carbonato de sodio al 7% (p/v) (Na_2CO_3 Sigma Aldrich $\geq 99.5\%$) y se completó con agua destilada hasta 2.000 µL. Luego de 60 min de reposo se leyó la absorbancia a 760 nm. Las lecturas de absorbancias se midieron en un espectrofotómetro UV/VIS Génesis 20 (Thermo Scintific, Waltham, Massachusetts, USA). Se preparó una curva de calibración con un estándar de ácido gálico (AG) a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 ppm.

1.6. Determinación de flavonoides en el extracto alcohólico

Una muestra de 500 µL del extracto alcohólico, fue mezclada con 150 µL de nitrito de sodio al 5 % (p/v) (NaNO_2), 150 µL de cloruro de aluminio al 10 % (p/v) (Merk, AlCl_3), 1000 µL de hidróxido de sodio 1M (NaOH Merck) y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 10 mL. Se prepararon cinco patrones de concentración 2,5 a 20 µg/mL, a partir de una solución patrón madre de (-)-epicatequina (EC) (Sigma Aldrich, $\geq 98\%$). La absorbancia se leyó a 510 nm, de acuerdo al método descrito por Scotti et al. (2020).

1.7. Caracterización cualitativa del extracto alcohólico por Espectrofotometría UV-visible

Para obtener el perfil UV Vis de los flavonoides presentes en la muestra, se realizó una dilución 1/50 del extracto, para su lectura en el Spectronic Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer (USA), desde 190 a 1.100 nm de longitud de onda, usando como blanco metanol.

1.8. Determinación del contenido de catequina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación del contenido de catequina, específicamente la (-)-epicatequina en el extracto metanólico, se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de acuerdo con el método descrito por Arlorio et al. (2008), con algunas modificaciones. Empleando un Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con detector de arreglo de Diodos, modelo 235C, Perkin Elmer (USA). Columna analítica Prevail Carbohydrate ES de dimensiones (250 mm x 4,6 mm) con relleno de un tamaño de partícula de 5 µm. Bomba HPLC Alltech, modelo 626, (USA), con un intervalo de presión de trabajo de 0 a 6000 psi y un intervalo de flujo de 0 a 12 mL/min).

Las condiciones cromatográficas empleadas en esta investigación fueron las siguientes: Fase móvil: Acetonitrilo (Acetonitrilo UV grado HPLC) - solución acuosa de ácido fórmico 0,2 % (80-20) (Ácido fórmico ≥ 98 % Merck). Flujo: 1 mL/min. Volumen de inyección: 20 µL. Longitud de onda: 280 nm.

El contenido de (-)-epicatequina en la muestra de cacao, se determinó mediante una curva de calibración de área versus concentración, elaborada con el patrón de (-)-epicatequina (Sigma Aldrich, ≥98%). A través de los valores de área obtenidos para cada elución y la curva de calibración, se determinó la concentración de (-)-epicatequina.

1.9. Determinación de la tensión superficial de una solución acuosa de extracto polifenólico de cacao

Se determinó la tensión superficial de una solución al 1 % v/v de extracto polifenólico de cacao en agua, empleando el método de Du Noüy (Velásquez et al., 2016) con un tensiómetro de anillo Fisher Scientific Surface Tensiomat Model 21 (Cole-Parmer, USA). La medida se realizó sumergiendo el anillo de platino-iridio en la solución a analizar, luego se lo hace ascender lentamente, desprendiéndose el líquido del anillo y volviendo a su posición original.

2. Resultados y discusión

2.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La evaluación morfológica de cacao fermentado y seco tanto partido como molido, se realizó mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido SEM con una ampliación de 500 y 1000X. De acuerdo con la Figura 4A, en la micrografía (ampliación 500X) de los granos partidos, se observaron superficies irregulares y tamaños desiguales, con una estructura tipo membrana, formada por diversos compuestos.

El detalle de la estructura tipo membrana se observó en la micrografía de la muestra a una ampliación de 1000x (Figura 4B). En algunas zonas se logró apreciar ciertas partículas de forma esférica soportadas en la estructura y en la superficie de la misma que podrían ser gotas de polifenoles (Martini et al., 2008), formadas debido al reordenamiento de los polifenoles provenientes de las células polifenólicas que fueron rotas en el proceso de partido y molienda del grano. Las células polifenólicas se encuentran en la epidermis y subepidermis de las raíces, hojas y en el mesófilo del cotiledón de las semillas del cacao. (Biehl et al., 1977; Jalal et al., 1977; Martini et al., 2008)

A través de las imágenes obtenidas por el SEM, algunas gotas polifenólicas fueron medidas, las cuales presentaron un tamaño aproximado entre 4 y 5 μm (Figura 4B). En algunas zonas de la membrana, se encontraron gotas aglutinadas y en otras dispersas. Según Martini et al., 2008, esto puede ser indicativo del grado de maduración del cacao. Superficies similares obtenidas con imágenes SEM han sido reportadas en investigaciones realizadas por otros autores (Martini et al., 2008; Hernández-Mendoza et al., 2021; Oloye et al., 2021).

Los tratamientos mecánicos que consisten en la disminución del tamaño de las partículas, producen una mayor disponibilidad de material extraíble. En la micrografía de los granos molidos a una ampliación de 500X (Figura 4C), se pudo observar como desaparecen las estructuras macroscópicas tipo membrana y quedan las gotas polifenólicas expuestas. A diferencia de la estructura macroscópica tipo membrana que si se ve alterada por el proceso de molienda. Esto permite una mayor accesibilidad al sustrato y más área superficial disponible para realizar la extracción de los polifenoles. En la micrografía de los granos molidos a una ampliación de 1000X (Figura 4D), se siguen observando en mayor cantidad las gotas polifenólicas, aunque más aglutinadas, posiblemente por el aumento del rompimiento de las estructuras de las células polifenólicas.

2.2. Caracterización del extracto alcohólico por Infrarrojo

El espectro en la Figura 5, corresponde al extracto alcohólico de los granos de cacao Canoabo a temperatura ambiente.

En las moléculas pertenecientes al grupo flavonoides, están presentes los siguientes grupos funcionales más resaltantes: doble enlace carbono - carbono aromático, cetonas, enlace carbono - carbono. Además de sustituciones de grupos hidroxilos -OH. Por lo tanto, para inferir la presencia de los grupos funcionales característicos de los flavonoides se empleó el espectro IR. En la elucidación de este espectro, se enfocó la atención especialmente en los flavan-3-ol o grupo de las catequinas, ya que 2 de los 3 grupos de polifenoles más importantes presentes en el grano de cacao, están conformados por los flaván -3-ol, en monómeros o en oligómeros y polímeros.

En el presente estudio, en la región de vibración de extensión X-H (4.000 cm^{-1} - 2.500 cm^{-1}), las vibraciones de extensión de enlaces C-H características, se identificaron a 3.311 cm^{-1} y 2.834 cm^{-1} , las cuales podrían identificar una gran variedad de grupos funcionales (Domínguez-Pérez et al., 2019).

La banda de 3.500 a 3.200 cm^{-1} está relacionada con la vibración de estiramiento de grupos O-H. En esta zona aparece una banda a $3.311,34\text{ cm}^{-1}$, la cual podría estar relacionada con la señal de los puentes de hidrógeno poliméricos posiblemente causados en gran medida por los grupos OH del metanol, también puede estar la señal de estiramiento H-O-H (3.600 - 3.100). En esta amplia banda igualmente se puede encontrar la señal solapada de los OH de los compuestos fenólicos (Nunes et al., 2016; Domínguez-Pérez et al., 2019; Rojo-Callejas 2020).

En la región de 2800 - 3000 cm^{-1} hay 2 bandas presentes, una a $2.946,03\text{ cm}^{-1}$ y otra a $2.834,52\text{ cm}^{-1}$. Esta es la región que indica la posible presencia de los grupos CH_3 y/o CH_2 . Estos grupos presentan una señal refleja en la zona entre 1.475 - 1.445 cm^{-1} , Como se puede ver en el espectro es la banda a $1449,3\text{ cm}^{-1}$, la que está relacionada con la presencia del grupo CH_3 y CH_2 (Rojo-Callejas, 2020).

Estas bandas pueden estar indicando la presencia del grupo CH_3 , proveniente del metanol usado como solvente. Además, si la banda obtenida en la zona entre 1.475 - 1.445 cm^{-1} , se acerca al valor 1.450 cm^{-1} (como lo es en este caso), puede indicar también, la presencia de grupos $-\text{CH}_2-$

presentes en ciclo alcanos (Rojo-Callejas, 2020), estructuras comunes en las moléculas del tipo flaván-3-ol.

En la región de $1.765 - 1.540 \text{ cm}^{-1}$ está presente 1 banda a $1.649,03 \text{ cm}^{-1}$. Esta es la región que indica la posible presencia de los grupos carbonilos correspondiente a las cetonas. En este intervalo la señal obtenida podría ser originada al estiramiento del carbonilo. Este grupo presenta una señal refleja en la zona 1.100 cm^{-1} . Como se puede ver en el espectro es la banda a $1.111,93 \text{ cm}^{-1}$, la cual está relacionada con la torsión del grupo carbonilo (Rojo-Callejas, 2020).

La Banda que se presenta a $1.449,30 \text{ cm}^{-1}$ está relacionada a la señal de los estiramientos C-C y C-O (Nunes et al., 2016; Domínguez-Pérez et al., 2019; Rojo-Callejas, 2020).

En la banda a $1.407,87 \text{ cm}^{-1}$, se identificó una señal atribuible a polifenoles. En particular, el pico alrededor de 1.285 cm^{-1} indicó un rasgo característico de los taninos a base de flavonoides. Este pico se asignó a la vibración etérea de estiramiento C-C, que surge de la estructura de anillo derivada de pirano de esta clase de taninos. Este pico se encuentra generalmente en los espectros de las catequinas y procianidinas (Nunes et al., 2016; Domínguez-Pérez et al., 2019; Irigoiti et al., 2019; Rojo-Callejas 2020).

La presencia de los flavonoides podría estar también sugerida por la señal obtenida en el pico intenso a $1.018,54 \text{ cm}^{-1}$, de interacciones C-C/C-O. Estas señales son solo complementarias, pues los estiramientos C-C, C-N y C-O caen en la misma región (Rojo-Callejas 2020). A través del análisis al espectro Infrarrojo se puede inferir, la presencia de los grupos funcionales característicos de los compuestos tipo flavonoides en el extracto alcohólico.

2.3. Determinación del contenido de polifenoles totales en el extracto alcohólico

El contenido de polifenoles totales determinado fue de $13.500,56 \pm 0,89 \text{ mg AG/L}$ del extracto concentrado proveniente del cacao fermentado y seco. El contenido de polifenoles expresado por gramo de cacao, presenta una cantidad de $14,21 \pm 0,06 \text{ mg AG/g}$.

El contenido de compuestos fenólicos de granos de cacao fresco, puede encontrarse en un intervalo de $34 - 60 \text{ mg/g}$, (Nazaruddin et al., 2006). Como se mencionó anteriormente existen diversos factores que afectan la cantidad de los compuestos fenólicos en los granos de cacao, como los edafo-climáticos, pre y pos cosecha, además de los procesos biosintéticos de los

compuestos. Por otra parte, destaca la disminución del contenido de polifenoles por el proceso de fermentado y secado del grano.

2.4. Determinación del contenido de flavonoides en el extracto alcohólico por espectrofotometría UV-visible

El contenido de flavonoides fue de $7.792,2 \pm 0,3$ mg EC/L ($8,20 \pm 0,03$ mg EC/g) en el extracto concentrado, valor que se encuentra en el rango reportado en estudio realizado por Avendaño et al. (2021), para determinar el contenido de flavonoides en granos de cacao secos y no fermentados de cuatro especies de *Theobroma* y de distinto origen mexicano, cuyo contenido varió de 1,61 a 30,35 mg/g. Así como superior al comparar los resultados con el estudio realizado por Sotero et al. (2011), quienes reportaron un contenido de flavonoides de 538,60 mg/100 g (5,39 mg/g) en semillas de cacao peruano.

El contenido de Flavonoides representó cerca del 58 % de los polifenoles totales presentes en la muestra de cacao Canoabo.

2.5. Caracterización cualitativa del extracto alcohólico por espectrofotometría UV-visible

Todos los fenoles absorben la radiación en la región UV, para los flavonoides en metanol, el espectro típicamente consta de dos bandas principales de absorción. La banda I está entre 300 y 560 nm, que es causada por la transición de electrones del grupo cinamoilo, y la banda II está entre 240 y 280 nm, que es causada por la transición de electrones del grupo benzoilo. Las posiciones precisas y las intensidades relativas de estas bandas proporcionan información valiosa sobre la naturaleza del flavonoide y su patrón de oxigenación (Feng et al., 2017)

La intensidad del espectro UV-Visible se atribuye a la transición electrónica de los orbitales tipos π , que depende del número y la ubicación de los grupos OH, OCH₃ y glucósidos de las diferentes clases de polifenoles. (Aleixandre-Tudo et al., 2018)

Las chalconas muestran una absorción en el rango de 340 a 390 nm, por lo tanto, si comparamos el valor del pico presentado en este rango en el espectro (Figura 6), con los valores reportados por Feng et al. (2017), da un indicativo de la presencia de este tipo de moléculas en el extracto.

El pico obtenido a 276 nm coincidió con el intervalo reportado por Nagarajan et al. (2008), para los monómeros del grupo de catequinas ((-)-epicatequina), los cuales muestran una absorción en el intervalo de 250-300 nm (banda II), mientras que los oligómeros presentaron un pico de absorción amplio en el rango de 325-550 nm de baja intensidad, con un máximo en 362 nm. En los resultados obtenidos se observó una curva con una zona de máxima absorción entre 350nm y 400nm, lo cual también podría indicar presencia de oligómeros de catequinas en el extracto.

Masyita et al. (2022), reportaron una absorción máxima de catequinas a una longitud de onda de 273 nm. También lo señaló la investigación de Rasidah et al. (2019), en la cual el resultado de UV-Vis espectrofotometría dio dos bandas de absorción, una longitud de onda de 272,6 nm (una banda I) y 202,2 nm (una banda II). En el caso del presente estudio, debido a la amplitud de la curva, ambas señales podrían estar solapadas.

Las antocianinas absorben en la región visible, generalmente a longitudes de onda 270-280 nm (banda II) y superiores a 465-560 nm (banda I) (Feng et al., 2017). Aunque no se evidenció la presencia de un pico claro en la zona de la banda I para antocianinas, en el espectro se observó que para la zona de la banda II si encuentra un pico con alta intensidad, que podría ser representativo para antocianinas, aunque el mismo podría estar solapado con el pico que indicó la presencia de catequinas.

En el extracto no se evidenció la presencia de otro tipo de flavonoides en estado monomérico.

2.6. Determinación del contenido de catequina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La identificación de los picos de HPLC de las (-)-epicatequinas, fue realizada con base en la comparación con el cromatograma a 280 nm del patrón de (-)-epicatequina, corridos bajo las condiciones especificadas anteriormente. El patrón mostró un tiempo de retención entre 8,083 min y 8,113 min. Identificando los picos de (-)-epicatequina a un tiempo de elución entre 8,136 min y 8,143 min en los extractos analizados. Los cromatogramas se observan en la Figura 7.

Esta muestra presentó una concentración de (-)-epicatequina de $1.434,4 \pm 0,6$ mg EC/kg ($1,43$ mg EC/g ± 0.02), presente en extracto polifenólico.

Los granos de cacao no fermentados son ricos en polifenoles, aproximadamente el 35% del contenido total de polifenoles corresponde a (-)-epicatequina, una de las dos clases principales de polifenoles, siendo la otra las antocianinas (Aprotosoaie et al., 2015; Ortiz et al., 2019; Urbańska et al., 2019). De las etapas de beneficio del cacao (fermentado y secado), la fermentación es la que mayor impacto genera en la variación del contenido de polifenoles totales (Pallares et al., 2016). Durante la fermentación, se producen importantes cambios bioquímicos, como la descomposición de los compuestos fenólicos, generando una importante disminución en el contenido de los polifenoles totales en los granos de cacao. Un estudio realizado por Ortiz et al. (2019) en cacao de diversas regiones de Bolivia, evidenció la disminución del contenido de polifenoles en cacao fermentado, haciendo el estudio entre cacaos fermentados y sin fermentar. Por ello se espera que el contenido de polifenoles determinado en este estudio sea inferior al promedio reportado (Aprotosoaie et al., 2015; Ortiz et al., 2019; Urbańska et al., 2019), para cacaos sin fermentar, independientemente del origen.

Otros estudios, como los de Payne et al. (2010), determinaron que el contenido de (-)-epicatequina en distintas muestras de cacao fermentado presentaron un intervalo de 0,78 – 1,69 mg/g de cacao fermentado. Por tal motivo es lógico encontrar valores de (-)-epicatequina en las muestras de cacao fermentadas y secas, más bajos que los reportados por la literatura para granos no fermentados.

Según Zapata et al. (2013) en el análisis a unas muestras de cacao colombiano, el contenido de (-)-epicatequina de los granos varió en un rango de 3,14 a 10,20 mg/g en granos sin fermentar, y de 0,26 a 3,90 mg/g en granos fermentados. En el caso del cacao Canoabo, el contenido de (-)-epicatequina en granos fermentados y secos fue de 1,43 mg EC/g. Esto indicó que los valores obtenidos, se asemejan a los reportados en cuanto a la disponibilidad de (-)-epicatequina en granos de cacao fermentados y secos.

A través de la cuantificación de (-)-epicatequina por HPLC, se evidenció y garantizó la presencia de esta molécula en el extracto alcohólico a incorporar en una formulación cosmética. La concentración hallada permite utilizar el cacao Canoabo como una fuente de polifenoles, específicamente de (-)-epicatequina. Los polifenoles del cacao son una de las principales moléculas responsables del efecto positivo en la piel. El contenido de (-)-epicatequina, se

encuentra presente en un 18 % m/m en el contenido total de flavonoides, lo que corresponde a un alto contenido, ya que en granos sin fermentar ni secar, el contenido de catequinas representa aproximadamente el 35 % del contenido de flavonoides (Ortiz et al., 2019).

2.7. Determinación de la tensión superficial de una solución acuosa de extracto polifenólico de cacao

Las medidas de tensión superficial de la solución acuosa del extracto metanólico al 1 % v/v dio un valor de 55,5 dinas/cm. Este valor fue comparado con la tensión superficial del agua (72,8 dinas/cm) y una solución acuosa de metanol al 1 % v/v (71,8 dinas/cm). El resultado evidenció que las especies presentes en el extracto polifenólicos, disminuyen de manera significativa la tensión superficial, tal como lo sugiere Reitzer et al 2018, señalando que los compuestos polifenólicos presentan actividad interfacial.

En una formulación cosmética tipo emulsión, este tipo de moléculas puede ubicarse en la interfase favoreciendo la estabilidad del producto. También pueden usarse para modificar el balance lipofílico-hidrofílico de las moléculas anfifílicas con las que puede estar interactuando en la formulación, permitiendo modular la morfología de la emulsión. (Reitzer et al 2018). También podría emplearse para estabilizar espumas. Nanopartículas hechas de α -lactoglobulina o caseínas y polifenoles en el rango de tamaño y disminuyen la tasa de drenaje de las mismas, debido a que aumentan el espesor de las películas por su adsorción en las interfases líquido/aire. (Rodríguez et al., 2015; Reitzer et al 2018).

Conclusiones

A través de la cuantificación de (-)-epicatequina por HPLC, se garantiza la presencia de esta molécula en el extracto alcohólico a incorporar en la formulación.

El contenido de Flavonoides representó casi el 58 % de los polifenoles totales presentes en la muestra de cacao. Mientras que la epicatequina, el 18 % m/m en el contenido total de flavonoides. Adicionalmente, empleando la espectroscopia de infrarrojo y UV-Visible, se determinó la presencia de flavonoides, sugiriendo la presencia de otras especies, además del grupo flaván-3-ol o catequinas.

Los polifenoles pueden comportarse como anfífilos, lográndose una disminución de tensión superficial del agua en 17,3 unidades de tensión, en relación a una solución acuosa al 1 % v/v de extracto polifenólico.

Con los resultados obtenidos se puede garantizar que el extracto contenido en una posible formulación con aplicación cosmética, contiene polifenoles y moléculas de (-)-epicatequina.

Abreviaturas

FTIR, espectroscopía infrarroja por transformada de fourier; UV, ultravioleta; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; SEM, microscopia electrónica de barrido; AG, ácido gálico; C, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina.

Referencias

- Adamska-Szewczyk, A. y Zgórk, G. (2019). Plant polyphenols in cosmetics – a review. *European Journal of Medical Technologies*. 3(24): 1-10.
- Aleixandre-Tudo, J. L., Nieuwoudt, H., Olivieri, A., Aleixandre, J. L. y du Toit, W. (2018). Phenolic profiling of grapes, fermenting samples and wines using UV-Visible spectroscopy with chemometrics. *Food Control*. 85: 11–22.
- Aljuffali, I.A.; Lin, CH.; Yang, SC. et al. (2022). Nanoencapsulation of Tea Catechins for Enhancing Skin Absorption and Therapeutic Efficacy. *AAPS PharmSciTech*. 23: 187
- Alvarado, M.; Portillo, E.; Boulanger, R.; Bastide, P. y Macia, I. (2020). Efecto del tratamiento poscosecha en los polifenoles del cacao de Biscucuy y Chabasquén, estado Portuguesa / Effect of postharvest treatment in cocoa polyphenols Biscucuy and Chabasquén, Portuguesa. *Revista De La Facultad De Agronomía De La Universidad Del Zulia*. 37: 224-228.
- Arlorio, M.; Bottini, C.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Bordiga M, Coisson J. y Tessitore L. (2009). Protective Activity of Theobroma cacaoL. Phenolic Extract on AML12 and MLP29 Liver Cells by Preventing Apoptosis and Inducing Autophagy. *J. Agric. Food Chem*. 57(22): 10612–10618. doi:10.1021/jf902419t
- Arlorio, M.; Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coisson, J.; Grosso, E.; Minassi, A. y 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 Chem*. 106(3): 967–975. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.009

- Aprotosoiaie, A.; Luca, S. y Miron, A. (2015). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15: 73-91. doi: 10.1111/1541-4337.12180
- Avendaño, C.; Campos, E.; López, C.; Martínez, M.; Caballero, J.; Flores, R. y Cadena J. (2021). Antioxidant activity in genotypes of *Theobroma* spp. (Malvaceae) in Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 69: 507-523. doi: 10.15517/rbt.v69i2.41626
- Bae, J.; Kim, N.; Shin, Y. et al. (2020). Activity of catechins and their applications. *Biomed Dermatol.* 4: 8.
- Biehl, B.; Passern, U. y 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: 41-52.
- Brglez, E.; Knez, M.; Skerget, M.; Knez, Z.; Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules.* 21: 901. doi:10.3390/molecules21070901
- Condori, M.; Aro, J.; Muñoz, A. y Rodríguez, J. (2020). Determinación de antocianinas y capacidad antioxidante en extractos de (*Muehlenbeckia volcanica*). *Revista de Investigaciones Alto Andinas.* 22(2): 161-169. doi: 10.18271/ria.2020.604
- Coșarcă, S.; Tanase, C. y Muntean, D. (2019). Therapeutic Aspects of Catechin and Its Derivatives – An Update. *Acta Biologica Marisiensis.* 2(1): 21-29. doi:10.2478/abmj-2019-0003
- Cherubim, D. J.; Martins, C. V.; Fariña, L. y Lucca, R. A. (2019). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology.* 1-5.
- Daud, Z.; Mohd, A.; Mohd, A.; Awang, H. y Mohd Z. (2013). Chemical Composition and Morphological of Cocoa Pod Husks and Cassava Peels for Pulp and Paper Production. *Aust J Basic Appl Sci.* 7: 406-411.
- Dias, M.C.; Pinto, D.C.G.A. y Silva, A.M.S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules.* 26: 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Domínguez-Pérez, L.; Lagunes-Gálvez, L.; Barajas-Fernández, J.; Olán-Acosta, M.; García-Alamilla, R. y García-Alamilla, P. (2019). Vibrational characterization of functional groups in cocoa beans during roasting with Fourier transform infrared spectroscopy. *Acta Univ.:* 29. doi:10.15174/au.2019.2172
- Ellinger, S.; Reusch, A.; Henckes, L.; Ritter, C.; Zimmermann, B. F.; Ellinger, J. y Helfrich, H.-P. (2020). Low Plasma Appearance of (+)-Catechin and (-)-Catechin Compared with Epicatechin after Consumption of Beverages Prepared from Nonalkalized or Alkalized Cocoa—A Randomized, Double-Blind Trial. *Nutrients.* 12(1): 231. doi:10.3390/nu12010231

Feng, W.; Hao, Z. y Li, M. (2017). Chapter II: Isolation and Structure Identification of Flavonoids. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. doi:10.5772/67810

Gordo, D. A. M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 9(1): 81-104.

Hernández-Mendoza, A.; Saldaña-Trinidad, S.; Martínez-Hernández, S.; Pérez-Sariñana, B. y Láinez, M. (2021). Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. (154): 106268. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106268>

Irigoití, Y.; Navarro, A. y Yamul, D. 2019. Actividad antioxidante y características espectroscópicas de extractos etanólicos de propóleos líquido y liofilizado. *CYTAL – ALACCTA*. 1-10.

Jalal, M. y Collin, H. (1977). Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry*. 116:1377-1380.

Lin, Y.; Tsai, M.; Fang, Y.; Fu, Y.; Huang, Y. y Wu, P. (2018). Microemulsion formulation design and evaluation for hydrophobic compound: Catechin topical application. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*. 161: 121–128. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.10.015

Martini, M. H.; Figueira, A.; Lenci, C. G. y Tavares, D. de Q. (2008). Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 31(3). doi:10.1590/s0100-84042008000300006

Masyita, Sayekti, E. & Nurlina. (2022). Flavonoid Compounds of the Catechin from Wungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) Leaves and the Sun Protecting Factor Value. *Jurnal Akademika Kimia*. 11(1): 31-38.

Nagarajan, S.; Nagarajan, R.; Braunhut, S.; Bruno, F.; McIntosh, D.; Samuelson, L. y Kumar, J. (2008). Biocatalytically Oligomerized Epicatechin with Potent and Specific Anti-proliferative Activity for Human Breast Cancer Cells. *Molecules*. 13(11): 2704–2716. doi:10.3390/molecules13112704

Nakano, E.; Kamei, D.; Murase, R.; Taki, I.; Karasawa, K.; Fukuhara, K. y Iwai, S. (2018). Anti-inflammatory effects of new catechin derivatives in a hapten-induced mouse contact dermatitis model. *European Journal of Pharmacology*. 845: 40-47.

Nazaruddin, R.; Seng, L.; Hassan, O. y Said, M. 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*. 24: 87-94.

Nazario, O.; Ordoñez, E.; Mandujano, Y. y Arévalo, J. (2018). Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. *RevIA*, 3(1).

Nunes, R.; Cordeiro, M.; Cabral, F.; Marquez, T.; Da Silva, R. y McGuinness, G. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria*. 21: 767–779. doi.org/10.1590/S1517-707620160003.0072

Oloye, M. T.; Jabar, J. M.; Adetuyi, A. O. y Lajide, L. (2021). Extraction and characterization of pectin from fruit peels of *Irvingia gabonensis* and pulp of *Cola milleni* and *Theobroma cacao* as precursor for industrial applications. *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi:10.1007/s13399-021-01366-4

Ordoñez, E. S.; Leon-Arevalo, A.; Rivera-Rojas, H. y Vargas, E. (2019). Cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), uva (*Vitis Vinífera*) y uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*. 10(2): 175-183.

Ortiz, J.; Chungara, M.; Ibieta, G.; Alejo, I.; Tejeda, L.; Peralta, C. y Peñarrieta, J. M. (2019). Determinación de teobromina, catequina, capacidad antioxidante total y contenido fenólico total en muestras representativas de cacao Amazónico Boliviano y su comparación antes y después del proceso de fermentación. *Revista Boliviana de Química*. 36(1): 40-50. doi:10.34098/2078-3949.36.1.4

Pallares, A.; Estupiñán, A.; Mauren, R.; Perea, J.; López, G. y López, L. (2016). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*. 29: 7-21.

Payne, M.; Hurst, W.; Miller, K.; Rank, C. y Stuart, D. (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: 10518–10527.

Ramos-Escudero, F.; Casimiro-Gonzales, S.; Fernández-Prior, Á.; Cancino Chávez, K.; Gómez-Mendoza, J.; Fuente-Carmelino, L. y Muñoz, A. M. (2021). Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *LWT*, 147: 111629. doi:10.1016/j.lwt.2021.111629

Rasidah, Syahmani, y Iriani, R. (2019). Identifikasi senyawa flavonoid dari kulit batang tanaman rambai padi (*sonneratia alba*) dan uji aktivitasnya sebagai antibakteri *staphylococcus aureus*. *Jurnal Jejaring Matematika dan Sains*, 1(2): 97-106.

Rauf, A.; Imran, M.; Abu-Izneid, T.; Iahtisham-Ul-Haq, Patel, S.; Pan, X. y Rasul Suleria, H. A. (2019). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 116: 108999. doi:10.1016/j.biopha.2019.108999.

Reitzer, F.; Allais, M.; Ball, V. y Meyer, F. (2018). Polyphenols at interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 257: 31-41.

Rodríguez, S.; Von Staszewski, M. y Pilosof, A. (2015). Green tea polyphenols-whey proteins nanoparticles: Bulk, interfacial and foaming behavior. *Food Hydrocolloids*. 50: 108-115. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.04.015

Rojo Callejas, F. (2020). Tablas de Espectroscopía Infrarroja. Departamento de fisicoquímica, Facultad de química. Universidad Nacional autónoma de México. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_34338.pdf 22/07/2020

Scotti, E.; Velásquez, I.; Ojeda, L.; Pacheco, F. y Noguera-Machado, F. (2020). Characterization and incorporation of an extract of passion fruit seeds (*Passiflora edulis*) in a hydrogel. *Revista Ingeniería UC*. 27 (3): 273-281.

Sinopoli, A.; Calogero, G. y Bartolotta, A. (2019). Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 297: 124898.

Sotero, V.; Maco, M.; Vela, J.; Merino, C.; Dávila, E. y García, D. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae Sterculiaceae. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 77 (1): 66-74.

Urbańska, B.; Derewiaka, D. y Lenart, A. (2019). Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. *Eur Food Res Technol*. 245: 2101-2112.

Valencia-Avilés, E.; Ignacio-Figueroa, I.; Sosa-Martínez, E.; Bartolomé-Camacho, M. C.; Martínez-Flores, H. E. y García-Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. (16): 15-29.

Vázquez-Ovando, A.; Ovando-Medina, I.; Adriano-Anaya, L.; Betancur-Ancona, D. y Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 66: 239-254.

Velásquez, I.; Muñoz, A. y Pereira, J. (2016). Tuning Interfacial Activity of Polymeric Resin-Surfactant/n-Alcohol Solution Interactions. *Journal of Surfactants and Detergents*. 19: 1025-1032.

Wang, T.; Li, Q. y Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13(1): 12-23. doi:10.1016/j.ajps.2017.08.004

Zapata, S. y Tamayo, A. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana Plantas Medicinales*. 18: 391- 404.

ANEXOS

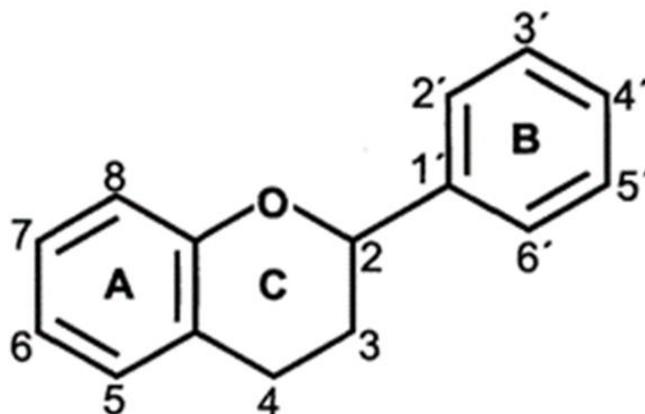


Figura 1. Estructura química básica y patrón numérico en polifenoles.

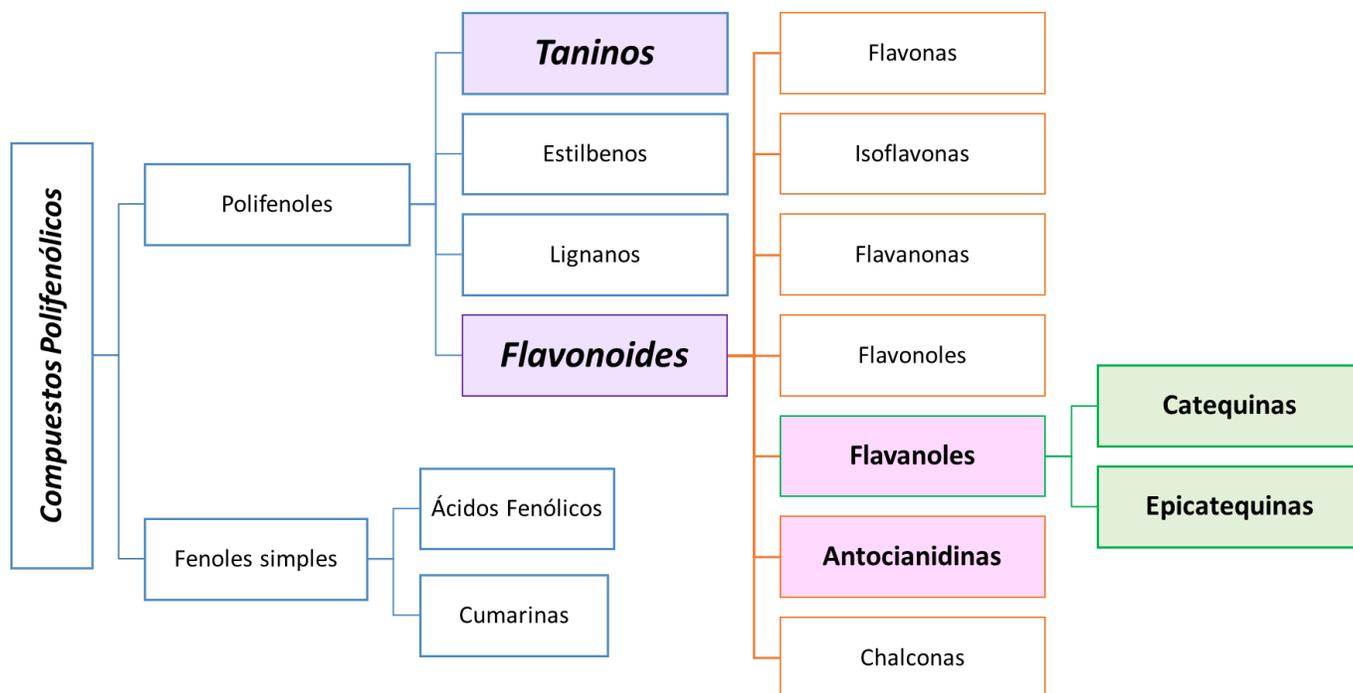


Figura 2. Esquema de clasificación general de los compuestos polifenólicos.

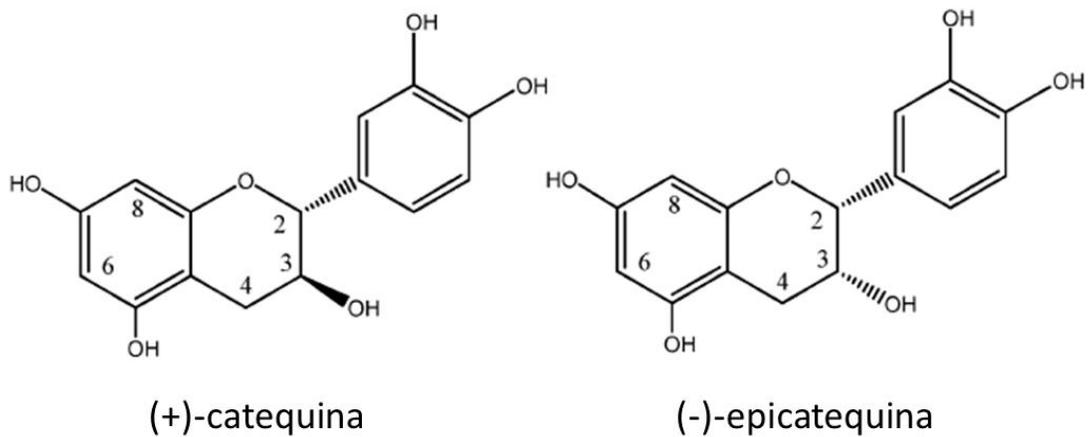


Figura 3. Estructura de (+)-catequina (C) y (-)-epicatequina (EC) presentes en los granos de cacao.

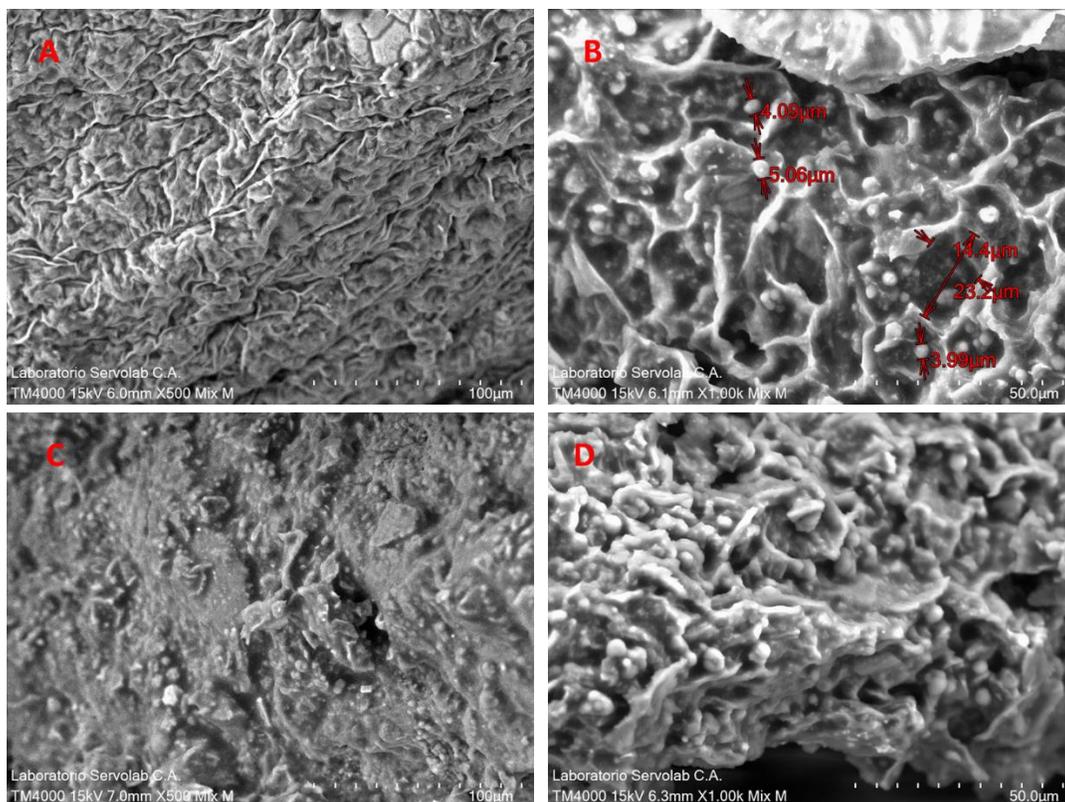


Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de granos de cacao fermentados y secados. (A) La estructura de los granos de cacao partidos a 500X de ampliación. (B) La estructura de los granos de cacao partidos a 1000X de ampliación. (C) La estructura de los granos de cacao molidos a 500X de ampliación. (D) La estructura de los granos de cacao molidos a 1000X de ampliación.

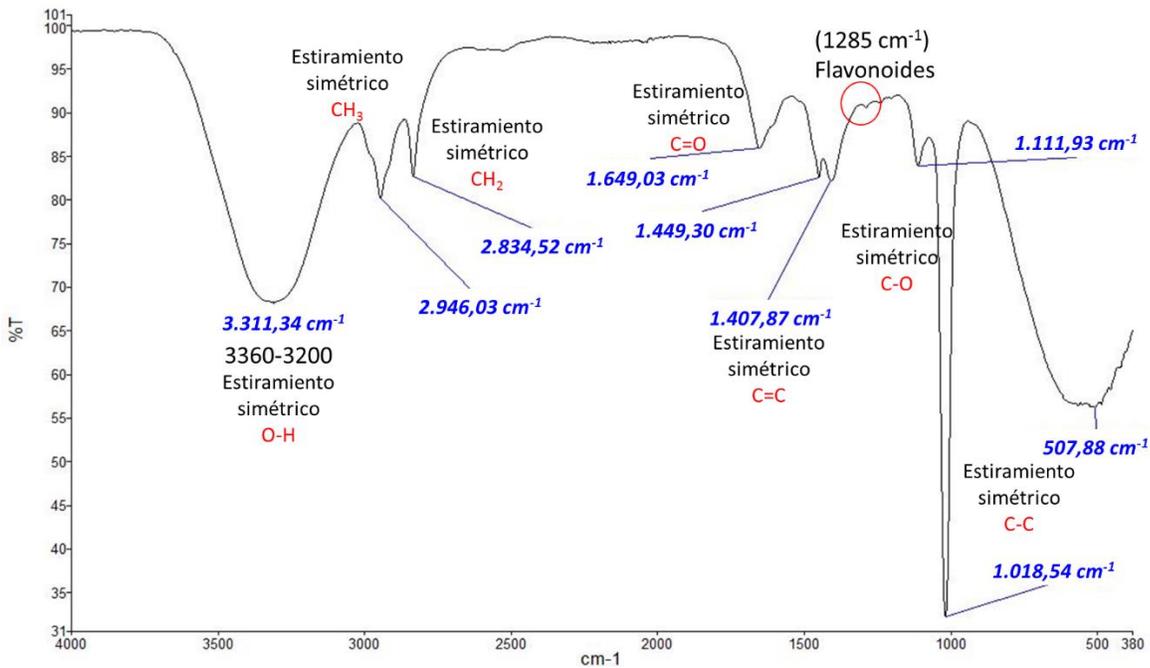


Figura 5. Espectro FTIR del extracto de polifenoles de cacao Canoabo a temperatura ambiente.

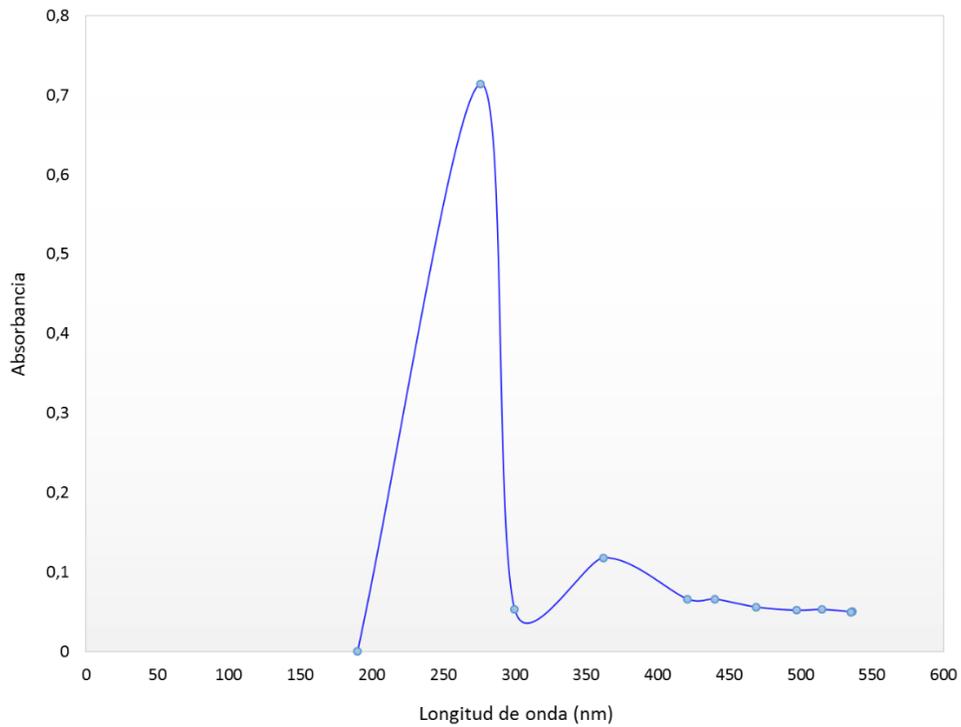


Figura 6. Espectro UV-Visible del extracto alcohólico de los granos de cacao Canoabo.

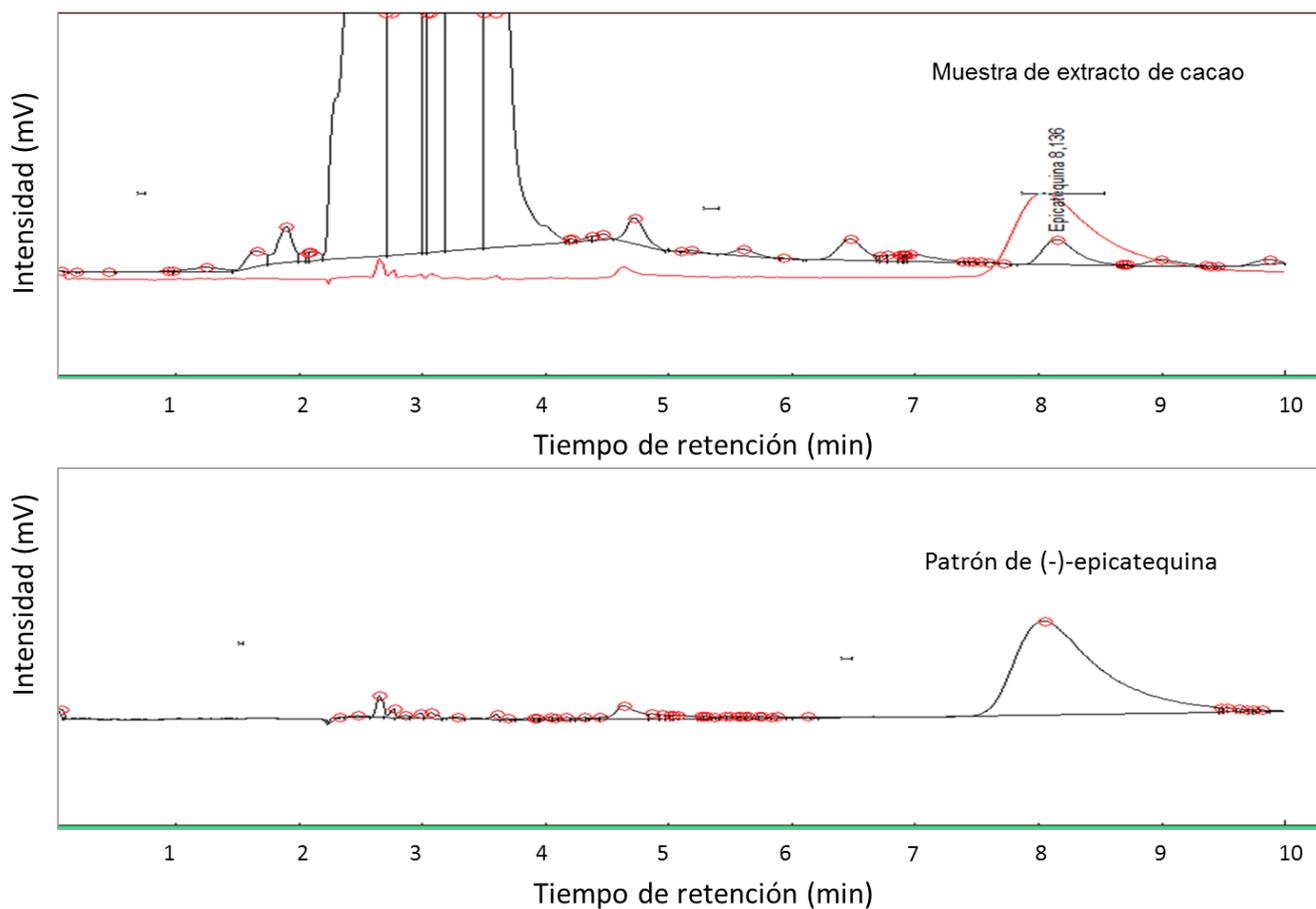


Figura 7. Cromatograma del extracto alcohólico de granos de cacao Canoabo. Abajo está la muestra comercial de epicatequina. Arriba: Es el extracto alcohólico