

Evaluación antioxidante de compuestos fenólicos obtenidos en la fermentación de residuos en la poscosecha de *Theobroma cacao L.*

Evaluation of phenolic compounds obtained from post-harvest fermentation of residues of *Theobroma cacao L.*

Nelson Alfonso Vega¹, Nicolás Santiago Gutiérrez²

Resumen

La presente investigación tiene como objetivo principal la evaluación de los compuestos fenólicos obtenidos de la fermentación de los residuos sólidos en la poscosecha del cacao (*Theobroma cacao L.*) como antioxidantes, para ello con el que se utilizaron 15 kg de cacao con el que se realizó la extracción del mucilago del cacao del que se, tomo 1 muestra diaria para la medición de pH, la identificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante cromatografía por HPLC/DAD, en la cual se detectaron compuestos como teobromina, teofilina, epigallocatequina, catequina, epicatequina, ácido p-hidroxibenzoico, cafeína, acadio cafeico, ácido vanílico, epigallocatequina galato, ácido p-cumárico, entre otros, la determinación de la actividad antioxidante es lo que se evaluara, se realizó por la decoloración del Beta-caroteno el cual decolora rápidamente sin la presencia de un antioxidante, la aplicación de los compuestos fenólicos se realizaron en productos cárnico embutidos tipo chorizos, en donde se sometieron a una evaluación sensorial para mirar su posible aceptación lo que permitió concluir que de los compuestos fenólicos extraídos del extracto de *Theobroma cacao L.* (mucilago) se pudo establecer que estos son una fuente importante de antioxidantes naturales.

Palabras clave: cacao, cromatografía, compuestos fenólicos, fermentación, inhibición, potencial.

1. Grupo de investigación GICITECA Universidad Francisco de paula Santander, Cúcuta Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5013-2146>

2. Grupo de investigación GICITECA Universidad Francisco de paula Santander, Cúcuta Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9543-9301>

Correspondencia: nealvec6@gmail.com

Abstract

The main objective of this research is to evaluate the potential of phenolic compounds obtained from the fermentation of solid residues in the post-harvest of cocoa (*Theobroma cacao*) in order to obtain the cocoa mucilage, 15 kg of cocoa were used for the extraction of the cocoa mucilage, which was subjected to a fermentation process for 5 days, The identification of phenolic compounds was carried out by HPLC/DAD chromatography, in which compounds such as theobromine, theophylline, epigallocatechin, catechin, epicatechin, and p-hydroxybutyric acid were detected, p-hydroxybenzoic acid, caffeine, acadio caffeic acid, vanillic acid, epigallocatechin gallate, p-coumaric acid, among others, the determination of antioxidant activity was carried out by the decolorization of beta-carotene, which decolorizes rapidly without the presence of an antioxidant, The application of the phenolic compounds was carried out in sausage-type sausage products, where they were subjected to a sensory evaluation to see their possible acceptance, which allowed us to conclude that the phenolic compounds extracted from the extract of *Theobroma cacao* (mucilage) were an important source of natural antioxidants.

Keywords: cocoa, chromatography, phenolic compounds, fermentation inhibition, potential

Introducción

Colombia cuenta con condiciones agroecológicas óptimas y excelentes materiales genéticos para la producción de cacao de grano fino, suave y un magnífico aroma [1]. Algunos estudios de [2], han descrito el origen de *Theobroma cacao* L. en la amazonia comprendida entre Colombia, Perú y Ecuador, siendo este un producto importante en los mercados de estos países [3], en Colombia *Theobroma cacao* L. ha venido en crecimiento que de acuerdo con [4], la mayor producción de cacao se da en los municipios de San Vicente del Chucurí y Landázuri respectivamente los cuales

son característicos no solo por la cantidad, sino también por la calidad; lo que motiva a plantear una solución para tratar, aprovechar y controlar la producción de la cascara de mazorca del cacao por ser el residuo más abundante y frecuente de la post cosecha [5], es por ello que autores como [6], mencionan que estos residuos son arrojados en el ambiente, como es caso de la cascara y el mucilago obtenido, siendo estos residuos los de mayor abundancia en este tipo de cultivos [7]. Este último ha sido utilizado para la elaboración de bebidas fermentadas [8], ya que este contiene de 10 a 15% de azúcar haciéndolo esencial para la producción de etanol [9], por lo que autores como [10], reportan que más de 70 litros de este

material se pierden a diario. Otro aspecto importante tiene que ver con las almendras; De acuerdo con [11], estas son ricas en polifenoles siendo estos compuestos los responsables del sabor y el aroma del cacao, es por ello que en la presente investigación el objetivo fue evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos obtenidos en el proceso de fermentación de los residuos en la poscosecha del cacao (*Theobroma cacao* L.) para la conservación de un producto cárnico embutido.

Materiales y métodos

El desarrollo de la investigación se dio en cinco etapas importantes, la primera etapa comprendió obtención del mucilago del (*Theobroma cacao* L.), como segunda etapa se llevó a cabo la fermentación del extracto, en la tercera etapa se realizó la determinación de los compuestos fenólicos mediante análisis por cromatografía, como cuarta etapa se realizó la evaluación de la actividad antioxidante mediante la utilización de la solución β -caroteno, como última etapa se realizó la preparación de un embutido cárnico y posterior análisis sensorial para la aceptación del producto.

Obtención del mucilago del (*Theobroma cacao* L.).

Para la obtención del mucilago del cacao se utilizaron 15 kg de *Theobroma cacao* L, en la cual se realizó un corte transversal a la ma-

zorca, extrayendo la semilla separando el grano del mucilago y así obtener el exudado.

Fermentación

El proceso fermentativo se realizó por un periodo de 5 días a temperatura ambiente, utilizando una levadura comercial, la cual se activó en una solución al 10 % de sacarosa durante 10 minutos en incubadora a 27 °C, controlado el proceso cada 12 horas, con tomo de muestra para analizar pH y grados Bx°. Este se llevó a cabo en un vaso fermentador de vidrio sellado por un tapón de corcho natural, al cual se le inserto una manguera produciendo una trampa de aire, permitiendo la salida de CO₂ producto de la fermentación a su vez impidiendo la entrada de cualquier producto contaminante; mientras que por la otra vía se dejó libre para la toma de muestra.

La determinación de los compuestos fenólicos por análisis por cromatografía

Para el análisis por cromatografía se realizó la preparación de las muestras analizadas disolviendo la muestra en una mezcla de metanol: agua al 0.2% en ácido fórmico (1:1), Vórtex (5 min) y posterior sonicación por 5 min y seguidamente inyección al equipo cromatográfico, se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC), Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente

(HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfaz del LC-MS fue la electronebulización (ESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones Orbitrap. Operado en modo positivo con un voltaje de capilar de 4,5 kV. Se utilizó una Columna Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9 μm de tamaño de partícula) a 30 °C, la fase móvil fue A: una solución acuosa de 0,2% de formiato de amonio y B: acetonitrilo con 0,2% de formiato de amonio. La condición inicial de gradiente fue de 100%, cambiando linealmente hasta 100% B (8 min); se mantuvo durante 4 min; el retornó a las condiciones iniciales en 1 min; el tiempo total de corrida fue de 13 min, con 3 min para post-corrída. La identificación de los compuestos se realizó usando el modo de adquisición full scan y la extracción de corrientes iónicas (EIC) correspondientes a los $[M+H]^+$ de compuestos de interés, medición de masas con exactitud y precisión de $\Delta\text{ppm} < 1$ y usando una solución-mix estándar de los compuestos (sustancias certificadas estándar), para la cuantificación de los analitos de interés se realizaron curvas de calibración empleando los materiales de referencia certificados.

Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se trabajó basada en la metodología planteada por [12] para la cual se preparó una solución stock con 0.08 gramos de Beta-caroteno en 60 ml de cloroformo, y se realizaron disoluciones de concentración de 0.1, 0.3, 0.4 y 0.6 M respectivamente, estas fueron dejadas evaporación hasta la sequedad, posteriormente se agregaron a cada frasco 0.02 ml de ácido linólico, 0.2 ml de Tween 20 y 0.2 ml de los extractos crudos. Las muestras se agitaron y posteriormente se agregaron 20 ml de agua oxigenada al 5% y se leyó la absorbancia a 470 nm, seguidamente las muestras fueron sometidas a ultrasonido en baño a 40°C, leyendo su absorbancia cada 10 minutos durante 120 minutos, el valor de la actividad antioxidante se calculó teniendo en cuenta la ecuación propuesta por [13], como un porcentaje de inhibición relativa para el control, la actividad antioxidante (AA).

$$AA = \frac{(R_{control} - R_{muestral})}{R_{control}} * 100$$

$$R = \left(In \frac{A_0}{A_t} \right) / t$$

Tomando a R como la velocidad de degradación de la muestra control, A0 como la absorbancia de la muestra control en el tiempo cero y At como absorbancia de la muestra control en el tiempo t.

Resultados

Extracción del mucilago

Del proceso de extracción realizado se obtuvo un total de 1500 ml de mucilago de cacao de los 15 kg de (*Theobroma cacao L.*) mencionados anteriormente .

Fermentación

Como resultado del proceso de fermentación se obtuvo 1300 ml del extracto con valores de pH entre 3.90 y 4.04, como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de pH y Grados Bx° del extracto.

Día	pH	Grados Bx°
0	3,90	17
1	3,91	17
2	3,98	17
3	4,02	17
4	4,04	17
5	4,05	17

Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos

El análisis cromatográfico cuantitativo reporto la presencia de 30 compuestos fenólicos como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos fenólicos identificados, por UHPLC-ESI

Compuesto	tR min	NMC mg kg ⁻¹	Concentración en las muestras mg kg ⁻¹
			992560-01-EB
			Muestra mucilago de cacao
Teobromina	2.6	0.1	34.4
Teofilina	2.9	0.1	<0.1
Epigallocatequina(EGC)	2.9	0.1	<0.1
Catequina	3.1	0.1	<0.1
Epicatequina	3.3	0.1	<0.1*
Ácido p-hidroxibenzoico	3.3	0.1	<0.1
Cafeína	3.1	0.1	2.3
Ácido cafeico	4.0	0.1	<0.1
Ácido vanílico	3.3	0.1	<0.1
Epigallocatequina galato	3.3	0.1	<0.1
Ácido p- cumarico	3.6	0.1	<0.1
Epicatequina galato	3.7	0.1	<0.1
Ácido felurico	3.8	0.1	<0.1
Quercetina	4.5	0.1	0.1
Ácido rosmarinico	4.0	0.1	<2.0
Cianidina	3.8	2.0	<0.1

Compuesto	tR min	NMC mg kg ⁻¹	Concentración en las muestras mg kg ⁻¹
			992560-01-EB
			Muestra mucilago de cacao
Luteolina	4.5	0.1	<0.1*
kaempferol	5.0	0.1	<0.1
ácido trans-cinámico	4.8	0.1	<0.4
naringenina	4.9	0.4	<0.1
pelargonidina	3.6	0.1	<0.1*
Apigenina	4.9	0.1	<0.1
Pinocembrina	5.9	0.1	<2.0
Ácido carnosico	7.5	0.1	<0.1
Cianidina 3 rutinosido	3.0	0.4	<0.1
Pelargonidina 3- glucosido	3.1	0.1	<0.1
Quercetina 3-glucosido	3.6	0.1	<0.1
Kaempferol 3-glucosido	3.8	0.10.1	<0.1
Rutina	3.5	0.1	<0.1
Ácido gálico	2.1	0.1	<0.1

En cual se presenta la teobromina como el compuesto fenólico de mayor abundancia

con una concentración de 34.4mg/kg ver figura 1.

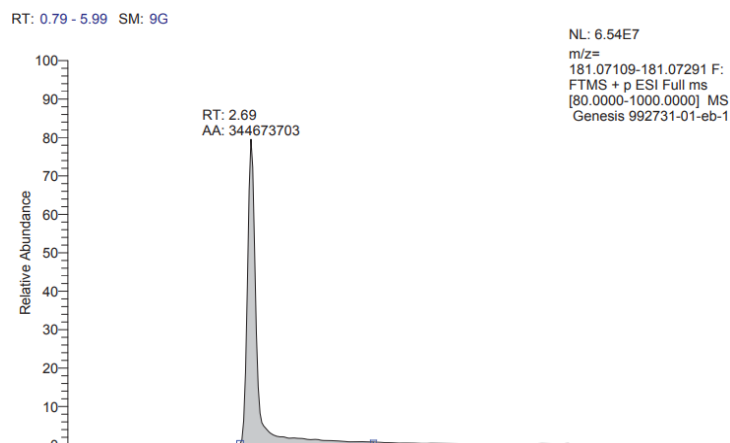


Figura 1. Fragmentograma de masas obtenidos para la teobromina

Determinación de la actividad antioxidante

En la determinación de la actividad antioxidante el Beta-caroteno se decolora rápida-

mente demostrando una disminución de la absorbancia como lo muestra la Tabla 3.

Tabla 3. Actividad antioxidante medida por la decoloración del β Caroteno a 470 nm.

TIEMPO (min)	Concentración (0,1)	Concentración (0,3)	Concentración (0,4)	Concentración (0,6)
0	1,33	1,57	1,63	1,76
Muestra sometida a ultrasonido en baño a 40 °C				
10	1,18	2,90	3,15	3,27
20	1,17	2,77	3,14	3,26
30	1,14	2,75	3,13	3,26
40	1,12	2,73	3,12	3,25
50	1,15	2,71	3,11	3,24
60	1,11	2,71	3,10	3,23
70	1,11	2,70	3,10	3,21
80	1,08	2,69	3,08	3,20
90	1,07	2,68	3,06	3,19
100	1,06	2,67	3,05	3,11
110	1,06	2,66	3,01	3,10
120	1,05	2,65	2,99	3,09

Así mismo la figura 1 muestra la disminución de la absorbancia de las diferentes concentraciones en relación al tiempo.

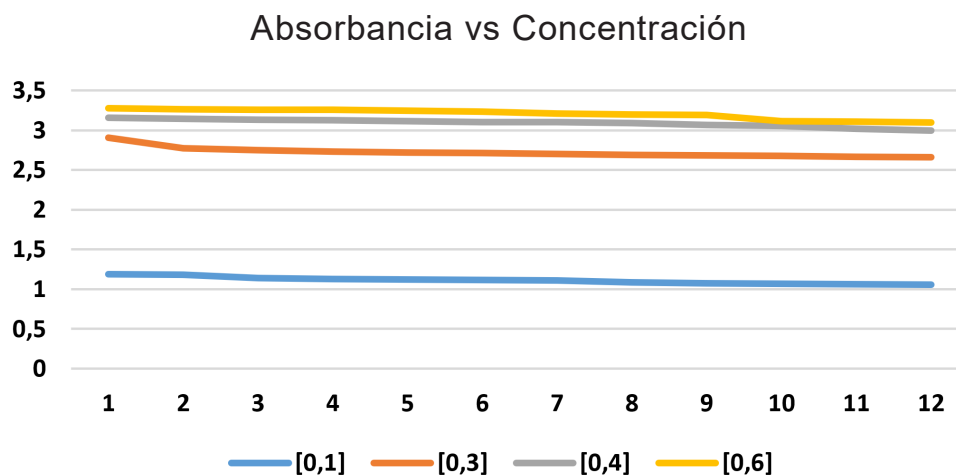


Figura 2. Disminución de la absorbancia a diferentes tiempos medidos en diferentes concentraciones.

En cuanto a la aplicación del compuesto fenólico se utilizó la metodología planteada por [14], aplicándose posteriormente en un producto embutido cárnico, utilizando tres prototipos del producto, variando el antioxidante en cada uno, para lo cual inicialmente se empleó como aditivo antioxidante, ácido ascórbico en una muestra control y dos más en muestras en las que se utilizó como antioxidantes los compuestos fenólicos extraídos de fermento del mucilago de *Theobroma cacao L.*, en una proporción de 0.2% posteriormente se realizó un análisis

sensorial del producto obtenido a 20 personas a las cuales se les presento una muestra del producto, eligiendo una opción de la escala de acuerdo a su grado de satisfacción en su color, sabor, olor, textura y aceptación general, la evaluación estadística se realizó mediante el paquete SPSS aplicando una prueba T (análisis de factor), donde se asignó un valor a cada termino, en el que 1 equivale a me disgusta mucho, 2 a me disgusta poco, 3 a ni disgusta ni me gusta, 4 a me gusta poco y 5 a me gusta mucho ver tabla 4.

Tabla 4. Resultados panel sensorial.

PANEL SENSORIAL DEL CHORIZO					
Escala	Color	Olor	Sabor	Textura	Aceptación General
Me disgusta mucho	0	0	0	0	0
Me disgusta poco	0	0	0	0	0
Ni me gusta ni me disgusta	1	1	0	1	0
Me Gusta Poco	4	7	1	7	5
Me Gusta Mucho	15	12	19	12	15
Total	20	20	20	20	20

En la tabla 5, se observa las características evaluadas en el cual los valores aceptación fueron muy cercanos, lo que indica una

aceptación del producto con respecto a cada una de las muestras elaboradas.

Tabla 5. Análisis de aceptación del producto.

		Color	Olor	Sabor	Textura	Aceptación
N	Valido	20	20	20	20	20
	Perdidos	0	0	0	0	0
Media		4,70	4,60	4,95	4,55	4,75
Error Estándar de la media		,128	,134	,050	,135	,099
Desv. Estándar		,571	,598	,224	,605	,444

Discusión

El extracto fermentativo obtuvo un pH bajo lo que de acuerdo [15], son valores extremadamente ácidos, que se debe principalmente a la presencia de diversos ácidos orgánicos fundamentalmente el ácido cítrico [16]. Así mismo se midieron los grados Bx° el cual se mantuvo en un valor 17 grados Bx°, valores que son comunes en los procesos de los fermentativos acusados por microorganismo [17]. así mismo la identificación de compuestos fenólicos permite establecer que polifenoles alcaloides como la cafeína y teobromina, indican la calidad organoléptica del cacao. [18], que de acuerdo con [19], estos presentan beneficios en la salud, ya que ayudan en el control de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y las derivadas del estrés celular, en cuanto a los demás compuestos identificados; las concentraciones fueron bajas, lo cual es un buen indicador antioxidante ya que previene significativamente la oxidación de sustratos [20], así mismo la disminución de la absorbancia es un indicador importante, ya que de otra forma este neutraliza los radicales libres formados sin la presencia de un antioxidante [21], en cuanto al análisis estadístico proporciono resultados que permitieron demostrar que para la muestra, el promedio se dio en un alto rango con respecto a su color, olor, sabor, textura y aceptación general, lo cual indica que el antioxidante extraído del mucílago del cacao no afecto en nada su sabor característico

del producto, ya que se encuentran fuertemente asociados con las características organolépticas [22], mostrando una alta capacidad de inhibir la oxidación en los productos cárnicos, por lo que autores como [23], [24], establecen que los polifenoles son importantes en los proceso de maduración, caracterización sensorial de los productos alimenticios, sin embargo [25], [26], en sus investigaciones mencionan que los compuestos fenólicos antioxidantes se deterioran con el procesamiento, esto debido a la exposición a temperaturas que oscilan entre los 110 y 160 °C, por otra parte debido a la grana importancia del cacao [27], lo propone a este como fuente para futuras investigaciones, esto debido a su capacidad antioxidante, lo cual permitiría innovar en la industria de los alimentos, en cuanto a la pulpa de mucílago del cacao de acuerdo con [28], en su investigación establece que esta posee características fisicoquímicas como azúcares, vitaminas y minerales que le brindan propiedades sensoriales como sabor y aroma agradables, es así como en la investigación la actividad antioxidante del mucílago de *Theobroma cacao L*, en la fermentación mostro una relación importante con los compuestos fenólicos anteriormente mencionados y que al ser aplicados en los productos cárnicos podrían traer beneficios para la salud de los consumidores ya que estos actúan como agentes oxidantes atrapando radicales libres presentes en nuestro organismo [29].

Conclusiones

El análisis de identificación realizado, permitió conocer la proporción de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de mucilago de cacao, siendo la teobromina el de mayor abundancia, que mediante el proceso de decoloración del Beta-caroteno permitió establecer que el extracto de mucilago de cacao posee la capacidad de ralentizar el proceso de oxidación, demostrando que existe una relación significativa, ya que presenta un aceptación del producto elaborado el cual entre los extractos de mucilago y la capacidad antioxidante, por lo que existe cualidades del material vegetal fermentado del mucilago de *Theobroma cacao* L. que pueden ser utilizadas en la industria alimentaria, como productos de conservación, siendo un posible sustituto de antioxidantes de origen químico.

Agradecimientos

A la Universidad Francisco de Paula Santander por su valiosa colaboración.

Declaración de conflicto de intereses

Declaramos que no existe conflicto de intereses entre los autores.

Referencia

1. Compradores – Colombia Trade [Internet]. Procolombia.co. [citado el 26 de julio de 2022]. Disponible en: <http://www.procolombia.co/compradores/es/explore-opportunidades/cacao-y-sus-derivados>
2. Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown JS, et al. Geographic and genetic population differentiation of the amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). PLoS One [Internet]. 2008;3(10):e3311. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
3. Acosta N, De Vrieze J, Sandoval V, Sinche D, Wierinck I, Rabaey K. Cocoa residues as viable biomass for renewable energy production through anaerobic digestion. Bioresour Technol [Internet]. 2018;265:568–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.100>
4. Agriculturayganaderia.com. [citado el 26 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.agriculturayganaderia.com/website/el-cultivo-del-cacao-y-su-contribucion-al-medio-ambiente/>
5. A y Eloka-Eboka Odubiyi AA, editor. Aprovechamiento de la cascara de mazorca de cacao en la elaboración de carbono activo para el tratamiento de aguas residuales. Vol. 4. International Journal of Environment and Bioenergy; 2012. <http://www.modernscientificpress.com/journals/ijee.aspx>
6. Ortiz García JE, Mejía Agudelo Y, González Morales DE, García-Alzate LS, Cifuentes-Wchima X. Alternativa de biorremediación a partir de residuos de cacao en la obtención de hongos *Pleurotus ostreatus* con la implementación de un análisis multicriterio. Rev Ion Investig Optim Nuevos procesos Ing [Internet]. 2020;33(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020007>
7. Da Silva GP Machado BAS y Uetanabaro APT NC de CG da SM, editor. Pulpa de cacao en la producción de cerveza: aplicabilidad y rendimiento del proceso fermentativo. Vol. 12. PLoS One; 2017. . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175677>
8. How to access research remotely [Internet]. Cabdirect.org. [citado el 26 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19766710577>

9. Braudeau J. El cacao: técnicas agrícolas y producciones tropicales. Blume; 1970. https://books.google.com.co/books/about/El_cacao.html?id=aQU-xgEACAAJ&redir_esc=y
10. Sánchez-Olaya DM, Rodríguez Perez W, Castro Rojas DF, Trujillo Trujillo E. Respuesta agronómica de mucilago de cacao (*Theobroma cacao L.*) en cultivo de maíz (*Zea mays L.*). *Cienc desarro* [Internet]. 2019;10(2):43–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.7958>
11. Vazquez-Ovando A, Ovando-Medina I, Adriano-Anaya L, Betancur-Ancona D, Salvador-Figueroa M. Cacao alkaloids and polyphenols: Mechanisms that regulate their biosynthesis and its implications on the taste and aroma. *Arch Latinoam Nutr.* 2016;66(3):239–54. <http://ve.scielo.org/pdf/alan/v66n3/art10.pdf>
12. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* [Internet]. 1996;384(3):240–2. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00323-7](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(96)00323-7)
13. Al-Saikhan, M. S., Howard, L. R., and Miller Jr, J. C., editor. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum, L.*). Vol. 60. *Journal of Food Science*; 1995. . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb05668.x>
14. Vega Contreras NA, Torres Salazar ML. Evaluación De Compuestos Fenolicos De (*Citrus sinensis*) Y Su Capacidad Antioxidante. *Cienc desarro* [Internet]. 2021;12(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.19053/01217488.v12.n2.2021.11635>
15. López-Navarrete MC. El proceso de fermentación del CACAO (*Theobroma cacao L.*). *AP* [Internet]. 2011 [citado el 26 de julio de 2022];4(1). Disponible en: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/572>
16. Pereira I, Campinas UE de, Efraim P, Silveira P, Martins M, Campinas UE de, et al. Caracterização da polpa de diferentes cultivares de cacau. En: *Resumos do. Universidade Estadual de Campinas*; 2019. <https://doi.org/10.20396/revpibic2720193045>
17. Bucheli P, Rousseau G, Alvarez M, Laloi M, McCarthy J. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao L.* seeds. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2001;49(10):5046–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jf010620z>
18. Payne MJ, Hurst WJ, Miller KB, Rank C, Stuart DA. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2010;58(19):10518–27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jf102391q>
19. Ortiz s. j, chungara m, Ibieta g, alejo i, Tejada l, Peralta c, et al. 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. *Rev boliv quím* [Internet]. 2019;1(36.1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.34098/2078-3949.36.1.4>
20. Kang HJ, Chawla SP, Jo C, Kwon JH, Byun MW. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresour Technol* [Internet]. 2006;97(4):614–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.037>
21. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1998;46(10):4113–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jf9801973>
22. Zapata Bustamante, S., Tamayo Tenorio, A., & Alberto Rojano, editor. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. Vol. 3. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.*; 2013. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000300007&script=sci_arttext&tlng=pt
23. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int* [Internet]. 2000;33(6):423–47. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969\(00\)00068-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969(00)00068-5)
24. Dilipkumar y Verma preeti. p, editor. flavonoids: a powerful and abundant source of antioxidants. Vol. 5. *Revista Internacional de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas*; 2013. https://web.archive.org/web/20180413072927id_/http://ijppsjournal.com/Vol5Issue3/7048.pdf
25. C. D. Di Mattia, G. Sacchetti, D. Mastrocola, y M. Serafini, “From cocoa to chocolate: The impact of processing on in vitro antioxidant activity and the effects of chocolate on antioxidant markers in vivo”, *Front. Immunol.*, vol. 8, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01207

26. Comparación del contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante del chocolate obtenido a partir de granos de cacao tostados y sin tostar de diferentes regiones del mundo. 2019. DOI: 10.3390/antiox8080283
27. Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México. <http://www.scielo.org.co/pdf/penh/v15n1/v15n1a2.pdf>
28. M. Gutiérrez, Actividad antioxidante de la harina de mucílago de cacao (*Theobroma cacao*) para su aplicación en la agroindustria. <https://www.eumed.net/es/revistas/economia-latinoamericana/oel-febrero21/harina-mucilago-cacao>
29. P. Jiménez, Methodology for the evaluation of antioxidant functional ingredients. Effect of the intake of grape antioxidant dietary fiber on antioxidant status and parameters of cardiovascular risk on humans. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1671/6494_perez_jimenez_jara.pdf