

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

**Evaluación del contenido de antioxidantes de cacao (*Theobroma cacao*
L.) durante su procesamiento en tres épocas del año**

Estudiante

Diego Torres Zuniga

Asesores

Raúl Espinal, Ph.D.

Jorge Cardona, Ph.D.

Honduras, agosto 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

A mis asesores y al Ph.D. Maldonado por tomarse el tiempo de explicarme y poder realizar esta investigación. Al Ph.D. Aguilar de la FHIA y a Allen González de Avenida Cacao por facilitarme las herramientas para completar dicha investigación.

Contenido

Agradecimientos	3
Contenido.....	4
Índice de Cuadros.....	6
Índice de Anexos.....	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	13
Ubicación del Estudio.....	13
Materia Prima	13
Tostado	14
Descascarillado	15
Molido	15
Diseño Experimental	15
Análisis Estadístico	16
Análisis Químico.....	16
Color	16
Polifenoles Totales.....	17
Actividad Antioxidante	18

	5
Resultados y Discusión.....	19
Análisis de Color para Tipo de Tostado.....	19
Valor L*	19
Valor a* y b*	19
Cuadro 1 <i>Color según tipo de tostado</i>	20
Análisis de Color para Época de Cosecha.....	20
Cuadro 2 <i>Color según época de cosecha</i>	21
Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante.....	21
Análisis Folin-Ciocalteu y DPPH Según Tipo de Tostado.....	21
Análisis Folin-Ciocalteu y DPPH según Época de Cosecha	22
Análisis Folin-Ciocalteu y DPPH Según Tipo de Tostado y Época de Cosecha	24
Conclusiones	26
Recomendaciones.....	27
Referencias.....	28
Anexos Anexo A <i>Minutos de tostado para tipo de tostado y época de cosecha</i>	32
Anexo B <i>Actividad antioxidante según época de cosecha</i>	33
Anexo C <i>Actividad antioxidante según tipo de tostado</i>	34
Anexo D <i>Actividad antioxidante según tipo de tostado y época de cosecha</i>	35

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Color según tipo de tostado	20
Cuadro 2 Color según época de cosecha	21
Cuadro 3 Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante según tipo de tostado.....	22
Cuadro 4 Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante según época de cosecha.....	24
Cuadro 5 Contenido de polifenoles totales según tipo de tostado y época de cosecha	24
Cuadro 6 Actividad antioxidante según tipo de tostado y época de cosecha	25

Índice de Anexos

Anexo A Minutos de tostado para tipo de tostado y época de cosecha	32
Anexo B Actividad antioxidante según época de cosecha.....	33
Anexo C Actividad antioxidante según tipo de tostado.....	34
Anexo D Actividad antioxidante según tipo de tostado y época de cosecha	35

Resumen

Se evaluó el contenido de antioxidantes en granos de cacao sin tostar y tres tipos de tostado de tres distintas épocas de cosecha. Se utilizó el análisis Folin-Ciocalteu para determinar la cantidad de polifenoles totales y el método DPPH para medir el porcentaje de inhibición y así evaluar la actividad antioxidante de los granos de cacao. Los polifenoles totales son compuestos bioactivos que se encuentran en cantidades significantes en el cacao y están relacionados con los antioxidantes, sin embargo, la cantidad encontrada se ve afectada por el procesamiento de los granos para su consumo como subproductos. El tostado es uno de los pasos más importantes en el procesamiento del cacao, ya que aporta características buscadas por los consumidores, como color, textura y sabor, pero tiene un efecto negativo en otras propiedades naturales, como en los polifenoles totales. Así mismo, la cantidad de polifenoles totales en el cacao se ve afectada por otros factores, como lo es el origen, las condiciones climáticas y agronómicas, la época de cosecha y los procesos de pos-cosecha. Todos estos factores tienen un efecto en el contenido de antioxidantes del cacao. Se demostró que la cantidad de polifenoles totales y actividad antioxidante se reduce conforme la temperatura de tostado aumenta y que la época donde ambas se encuentran en mayor cantidad es en el mes de junio.

Palabras clave: DPPH, época de cosecha, Folin-Ciocalteu, polifenoles totales, porcentaje de inhibición .

Abstract

The antioxidants quantity in cacao beans was evaluated in raw and three different roasting temperatures, from three harvest seasons. The Folin-Ciocalteu method was used to determine the quantity of phenolic compounds and the DPPH method was used to measure the anti radical scavenging percentage to evaluate the antioxidant activity in cacao beans. Phenolic compounds are bioactive compounds that are found in significant quantity in cacao beans and are related to antioxidants, however, they are affected by cacao bean processing in order to offer subproducts to consumers. Roasting is one of the main steps in cacao bean processing, since it contributes to characteristics that consumers are looking for, such as color, texture, and flavor, but it has a negative impact in other natural properties, such as phenolic compounds. Also, the quantity of phenolic compounds is affected by other factors such as origin, climatic and agronomic conditions, harvest season and post-harvest processes. All these factors have an impact in cacao bean's antioxidants quantity. It was demonstrated that the content of phenolic compounds and the antioxidant activity is reduced as roasting temperature increases and the harvest season in which both are found in greater quantities is in June.

Keywords: Anti-radical scavenging percentage, DPPH, Folin-Ciocalteu, harvest season, phenolic compounds.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol proveniente de América y a través de los años ha tenido mucho auge en otros continentes como en África. Este esplendor puede ser atribuido a que estudios han demostrado que el cacao y sus derivados son uno de los alimentos que poseen más propiedades antioxidantes (Dreosti 2000). “Los antioxidantes son compuestos químicos que el cuerpo humano utiliza para eliminar radicales libres, que son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células y producen la oxidación de sus diferentes partes, alteraciones en el ADN y cambios diversos que aceleran el envejecimiento del cuerpo” (Ramírez et al. 2012). Diferentes estudios también han demostrado que una parte de los antioxidantes que brinda el cacao son perdidos en el proceso de tostado y fermentado, paso clave para obtener chocolate de mayor calidad (Hong et al. 2004). El cacao tiene un rango amplio de tostado por lo que se puede categorizar en “light, medium, y dark”, refiriéndose a claro, mediano y oscuro, dependiendo de la temperatura a utilizar.

El tostado, necesario para dar el característico aroma, color y sabor en el procesamiento del cacao, se realiza generalmente a una temperatura de 110 hasta 150 °C durante 25 a 50 minutos (Plúa 2008). Sin embargo, la temperatura y tiempo de tostado son establecidos dependiendo de las características que se le quieran conferir al producto final, por lo que varía en gran manera entre los procesadores de cacao. Así mismo, el tostado es necesario para facilitar la remoción de la cáscara y liberar el producto de interés para la agroindustria, denominado nib. El color después del tostado es otro de los parámetros que se ve afectado, debido a un pardeamiento adicional al que ocurre en la fermentación y secado (Ortiz et al. 2009).

Así mismo, se sabe que la época de cosecha del cacao puede afectar sus propiedades nutricionales debido a las diferencias climáticas. Los niveles de antioxidantes son dependientes de las condiciones de pre y pos cosecha (Darré 2019). En Honduras, existen dos períodos de cosecha de cacao, una en entre octubre y diciembre y la segunda de marzo a abril (Flores et al. 2016). Es importante saber cómo el contenido y actividad antioxidante de los granos de cacao también se ve

afectado por estos períodos de cosecha. Uno de los métodos para determinar cómo estos factores afectan el contenido de antioxidantes, ya sea por su época de cosecha o procesamiento, es a través del método Folin-Ciocalteu, el cual cuantifica la cantidad de polifenoles totales. Este método se basa en el principio de que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu a un pH básico, resultando en una coloración azul que puede ser determinado a través de espectrofotometría a 765 nm (García Martínez et al. 2015). Para medir la actividad antioxidante, se puede utilizar la técnica de radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo, también conocida como DPPH. El DPPH es un método en el cual se utiliza un radical libre para reaccionar con compuestos antioxidantes que realizan la donación de un átomo de hidrógeno (Guija et al. 2015).

Este estudio fue realizado en la FHIA, Avenida Cacao, la planta hortofrutícola Zamorano y el LAAZ (Zamorano), y se basó en evaluar el contenido y la actividad de los antioxidantes del cacao en su procesamiento y en tres épocas de cosecha del año 2019 de diferentes regiones de Honduras. A través de esta investigación fue posible determinar en qué época del año el cacao contiene más antioxidantes, así como a que temperatura y tiempo de procesamiento mantiene mejor dicha propiedad. Esto será de mucha ayuda para todo el sector de la agroindustria que quiere brindar productos con características que sean de mayor beneficio para la salud de los consumidores. Esta investigación puede relacionarse a una gran cantidad de áreas que se enfocan en brindar productos naturales con mayor beneficio nutricional para las personas, investigando que sus características nutricionales se vean afectadas lo menos posible en su procesamiento. Además, puede ser el comienzo para la búsqueda y procesamiento de otros productos con altas propiedades saludables naturales en Honduras.

Los objetivos para este estudio fueron:

Determinar en qué época de cosecha el cacao contiene más cantidad y actividad de antioxidantes.

Evaluar la cantidad y actividad de los antioxidantes de los granos de cacao sin tostar y después de su tostado a tres temperaturas distintas.

Materiales y Métodos

Ubicación del Estudio

Esta investigación se realizó en dos distintos lugares dentro de la República de Honduras, uno para el tostado del cacao y otra para el análisis químico de antioxidantes. El tostado de los granos se realizó en Avenida Cacao, empresa en San Pedro Sula, Cortes. La FHIA (Fundación Hondureña para Investigación Agrícola), ubicada en La Lima, departamento de Cortés, quienes proveyeron las respectivas muestras de cacao para llevar a cabo dicha investigación. La evaluación del color y contenido de antioxidantes se realizó en el LAAZ (Laboratorio de Análisis de Alimentos, Zamorano) en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada a 30 km de Tegucigalpa, carretera a Danlí, Valle del Yeguaré, San Antonio de Oriente, Departamento Francisco Morazán.

Materia Prima

La materia prima fueron los granos de cacao provenientes de distintas regiones del territorio hondureño, los cuales, ya estaban previamente fermentados y estaban almacenados en la FHIA. Estos granos de cacao fueron una combinación de los tres principales tipos que existen, trinitario, forastero y criollo, los cuales se recolectaron en el año 2019 y se mezclaron de manera aleatoria, y fueron almacenados en las condiciones necesarias para mantener su respectiva calidad. Alrededor del 90% de los granos de cacao son de tipo trinitario. El almacenamiento de estos granos se realizó por lotes, previamente rotulados con la época en la que se realizó la cosecha, utilizando las épocas de enero a abril, de mayo a agosto y de septiembre a diciembre. De esta manera, se contó con tres épocas de cosecha distintas para medir cómo el tostado a diferentes temperaturas afecta el color de los granos y la cantidad de antioxidantes en cada una de ellas. Se necesitó un total de 5.2 kg de granos de cacao, 1.72 kg por cada una de las épocas, ya que se midieron tres temperaturas de tostado distinto, realizando tres repeticiones y una muestra sin tostar de cada una de las épocas la cual fue la representación del grano sin tostar, obteniéndose un total de 12 muestras por repetición y utilizando 140 g para cada una de ellas. Para medir el peso se utilizó una balanza de mesa con capacidad para 5

kg. Cada muestra se depositó en un frasco de vidrio para separarlas y se rotuló con la época de cosecha, temperatura a la cual se tostó, peso en g y número de repetición al que pertenece. Se selló herméticamente con su respectiva tapa y se almacenó hasta su análisis en el LAAZ.

Tostado

Para el tostado se utilizó un horno de convección Avanti Mini Kitchen, modelo MKB428, a 250 °F, el cual se precalentó por 10 min. Se realizó el tostado del cacao a tres temperaturas y tiempos distintos, para ver en cuál la pérdida de antioxidantes es mayor. Se usaron las temperaturas y tiempos (Anexo A) de 115 °C/14 min para light roast, 125 °C/20 min para medium roast y 130 °C/30 min para dark roast, utilizando un cronómetro para tomar el tiempo y revisando aproximadamente cada 5 minutos que los granos se encontraran a la temperatura estipulada utilizando un termómetro infrarrojo. Al medir la temperatura con el termómetro infrarrojo, es importante apuntarlo a varios granos colocados en diferentes partes de la bandeja del horno para verificar que todos tienen una temperatura aproximadamente igual (Tostado uniforme) y hacerlo de la manera más eficaz posible para perder la menor cantidad de calor dentro del horno. Los minutos hacen referencia al tiempo que se tardó en llegar a esa temperatura de tostado específica, por lo que puede variar dependiendo de las condiciones del grano y climáticas. Se esperó un tiempo de 10 minutos después de sacar la muestra del horno cada vez que se realizó el tostado para que esta se enfriara. Con la ayuda de guantes de cuero resistentes al calor y temperatura, se introdujo cada muestra en un frasco de vidrio de 16 oz, sellándolo con la tapa y rotuló de acuerdo a la época, temperatura, peso, tiempo de tostado y repetición de la muestra. Se repitió tres veces cada temperatura en las tres épocas de tostado, más la muestra sin tostar de cada época. En cuanto a las muestras de cada época sin tostar, se colocó en el frasco de vidrio y se rotuló la época a la que pertenecen. Todas las muestras en frasco fueron almacenadas en un mismo lugar, impermeable, donde no les dio la luz solar directamente, libre de humedad y plagas, de olores que puedan afectar la calidad del cacao, con una temperatura lo más constante posible y que no excediera los 35 °C.

Descascarillado

El descascarillado se realizó utilizando un triturador marca CocoaTown con motor para reducir el tamaño de los granos y un descascarillador marca CocoaTown Basic Winnower para remover la cascarilla de manera que quedaran las partículas de nib de cacao separadas de los residuos de cáscara. Se realizó este proceso de manera individual para cada frasco previamente rotulado en la etapa de tostado y se limpió con papel toalla el equipo antes y después de cada muestra para no mezclar las mismas y asegurar que no quedaran residuos de otro frasco. Se guardó los nibs de cacao en el frasco con su tapa correspondiente de manera hermética.

Molido

El proceso de molido se realizó para obtener una muestra más homogénea para realizar el análisis de polifenoles totales y el DPPH, ya que se utilizó el espectrofotómetro y las partículas deben de ser pequeñas y similares para que los resultados no se vieran afectados. Se pesaron 50 gramos de cada una de las 36 muestras en una balanza analítica y se procedió con el molido en un molinillo de café marca Kitchen Aid por 15 segundos hasta asegurar que los nibs de cacao se volvieran polvo. Se limpió el molinillo entre cada una de las muestras, asegurando que no quedaran partículas de la anterior. Luego, se vertió el polvo en una bolsa ziploc previamente rotulada describiendo el tipo de tostado, la época a la cual pertenece el cacao y el número de repetición. Por último, se guardaron las muestras en las bolsas en un lugar seco con una humedad relativa del 67% y con sombra.

Diseño Experimental

Se realizaron dos ensayos para esta investigación, en el primer ensayo se usó un Diseño Completamente al Azar, siendo los tratamientos la evaluación de tres épocas de cosecha para cuantificar la cantidad de antioxidantes del cacao. En el segundo ensayo se usó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial de tratamientos cuatro por tres, siendo los factores las tres temperaturas de tostado, la muestra sin tostar y tres épocas de cosecha. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento en cada ensayo, para un total de 36 unidades experimentales.

Análisis Estadístico

Se analizaron los datos obtenidos a través del programa SAS® (Statistical Analysis System), versión 9.6. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una separación de medias Duncan para las variables de los factores principales (Color, polifenoles totales y % inhibición para época y tostado). Para la interacción entre época y tostado de polifenoles totales y % inhibición, se hizo un análisis de varianza y una separación de medias a través del método LSMEANS (Método de cuadrados mínimos o medias ajustadas) para poder determinar las interacciones y las respectivas diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados. El grado de significancia fue de 95% ($P < 0.05$).

Análisis Químico

Color

El análisis de color de los granos de cacao se realizó con el colorímetro marca Colorflex HunterLab del LAAZ siguiendo su respectiva metodología. El color de los nibs de cacao según su tostado y época de cosecha se midió a través del espacio de color $L^*a^*b^*$; L^* representando la luminosidad, a^* para los componentes de color rojo-verde ($+a^*$ =más rojo) y b^* amarillo-azul ($+b^*$ =más amarillo). Se inició el programa y estandarizó con los discos para dicha función en el orden correspondiente, negro, blanco y verde. Luego, se revisó que las lecturas fueran conformes al estándar $L^*a^*b^*$, con un margen menor a 5% de diferencia. Se procedió a tomar cada frasco con los nibs de cacao y llenar el simple cup con ellos hasta no dejar ningún espacio por donde pudiera pasar la luz. Se colocó el simple cup en el HunterLab y se realizó la lectura de cada una de las muestras tres veces, limpiando el simple cup entre cada muestra. Se anotó los valores $L^*a^*b^*$ obtenidos para cada uno de los 36 frascos, especificando a que época, tipo de tostado y número de repetición correspondían los mismos. Se tabularon los datos en un Excel para obtener el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para su análisis e interpretar como el tostado afecta el color de los granos de cacao.

Polifenoles Totales

Se adaptó la metodología utilizada por Suazo Mercado (2012) y Martínez (2019) para la evaluación de la cantidad de polifenoles totales a través del reactivo Folin-Ciocalteu. Se realizó una curva estándar con R^2 0.9998 para concentraciones de ácido gálico entre 100-600 ppm, con intervalos de 100 ppm. Se pesó 1 ± 0.0050 g en una balanza OHAUS AX224/E de muestra de cacao molido y homogenizado, se colocó en tubos de 50 mL aforado con un medio de solución 80:20 Metanol/agua. Posteriormente, se utilizó el equipo WB 1024 Water bath de Tecator Line para realizar un baño María a 50 °C por 2 h, con la función de agitado automático encendida. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente por una hora y se filtró las muestras individualmente con la ayuda de filtros de café y un kitasato/matraz Büchner conectado a una manguera para obtener un vacío. Luego, se aforó hasta 50 mL con la solución metanol/agua a 80:20. Se tomó 1 mL de muestra. Se procedió a adicionar 2.5 mL del reactivo Folin al 0.5 N, se agitó en un Vortex marca Fisherbrand a 2500 rpm por 30 segundos y se dejó reposar 5 minutos. Luego, se añadió 10 mL de Carbonato de Sodio al 1 N, se agitó en el Vortex a 2500 rpm por 30 segundos y se dejó reposar 6 minutos. Finalmente, se enrazó hasta 25 mL y se dejó reposar 30 minutos. Para realizar la lectura en el espectrofotómetro, se agregó 1 mL de muestra en solución y 2 mL de solución metanol/agua 80:20 a un tubo de ensayo para diluirlo y obtener valores de absorbancia dentro de la curva estándar. Se agregó 2 mL de esta dilución a la cubeta de cuarzo y se realizó una lectura para cada muestra (Limpiando la cubeta con agua destilada y secándola con papel toalla entre cada una) en un espectrofotómetro de UV visible marca Agilent Technologies Cary 8454 Vic Au, a una longitud de onda de 765 nm. Se comparó con la curva estándar comparando las concentraciones obtenidas como mg equivalentes de ácido gálico en 100 g (mg EAG/100 g). Para obtener los resultados se utilizaron las Ecuaciones 1 y 2:

$$ppm = \left[\frac{(\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Intercepto de la curva estandar})}{\text{Pendiente de la curva estandar}} \right] \times \text{Factor de dilucion} \quad [1]$$

$$\frac{mg \text{ EAG}}{100 \text{ g}} = \left[\frac{ppm}{1000 \times \text{Peso de la muestra}} \right] \times 100 \quad [2]$$

Actividad Antioxidante

El análisis para medir la actividad de antioxidantes en todas nuestras muestras fue el método DPPH (Técnica de radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), el cual es muy utilizado para medir la actividad antioxidante de los alimentos. Se adaptó la metodología utilizada por Ordoñez et al. (2019) y Priftis et al. (2015). Primero, se realizó una curva estándar con un R2 de 0.9992 para concentraciones de ácido gálico entre 100-600 ppm, con intervalos de 100 ppm. Para la preparación de las muestras se pesó 0.5 ± 0.0050 g de la muestra en una balanza marca OHAUS AX224/E y se colocó en un tubo para centrifuga de 15 mL, luego se agregó 10 mL de Metanol puro. Se llevó a la centrifuga marca VWR modelo Symphony 4417R, a 2500 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se tomó 0.1 mL de la muestra y se colocó en otro tubo de ensayo, marcándolo adecuadamente. Se agregó 1.9 mL de una solución de DPPH al 100 uM en Metanol, y se agitó en un vortex marca Fisherbrand por 30 segundos a 2,000 rpm. Cada tubo se cubrió con papel aluminio y se colocó en un cuarto oscuro a temperatura ambiente reposando por nueve minutos. Se realizaron las lecturas para cada muestra en un espectrofotómetro de UV visible marca Agilent Technologies Cary 8454 Vic Au a una longitud de 515 nm. Se utilizó cada lectura para calcular el porcentaje de inhibición del DPPH y así medir la actividad antioxidante, empleando la Ecuación 3:

$$\% \text{ Inhibicion DPPH} = \left[\frac{Ac - Am}{Ac} \right] \times 100 \quad [3]$$

En donde: Ac: Absorbancia del control, Am: Absorbancia de las muestras.

Resultados y Discusión

Análisis de Color para Tipo de Tostado

Valor L*

En el Cuadro 1 se observa el cambio de color en los nibs de cacao según el tostado, se obtuvo que en el valor L*, el crudo presenta diferencia con el light y medium ($P \leq 0.05$), mientras que es similar con el dark roast. No se encontró diferencias entre light, medium y dark ($P > 0.05$). Estos valores difieren de los resultados obtenidos por Krysiak (2006), en los cuales se espera un oscurecimiento de los granos de cacao después de pasar por el proceso de tostado debido al aumento de pigmentos color marrón. Los resultados pudieron haber sido afectados debido a que algunos de los nibs crudos aun llevaban algunas partículas de la cascara de cacao. Sin embargo, esto no explica por qué no existe diferencia de la luminosidad entre los tres tipos de tostado, pero puede ser atribuido a los resultados obtenidos por Żyźelewicz et al. (2014), quienes explican que, a mayor tiempo de tostado, los pigmentos marrones pueden disminuir por quemaduras en los granos de cacao. Esto explica por qué la luminosidad de los nibs crudos difieren del tostado light y medium, pero es similar al dark, el cual es el tostado que dura mayor tiempo. Así mismo, Krysiak et al. (2013) determinaron que el color también se ve afectado en el tostado por la reacción de Maillard, la cual le da su característico color marrón a los granos de cacao.

Valor a* y b*

El valor a*(6-8) presentó diferencias entre los nibs crudos y dark, pero no difieren entre crudo, light y medium, ni en light, medium y dark. En el valor b*(5-6), el crudo, light y medium son significativamente parecidos, así como el crudo, light y dark. En el caso del valor a* y b*, no se presentó una tendencia en los valores, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Suazo Mercado (2012), en donde no se observa una tendencia en los valores en función de época de cosecha o tipo de tostado del cacao. Los posibles factores que afectaron el comportamiento de los valores a* y b* aparte del tostado, fue el hecho de que los granos pertenecen a tres épocas de cosecha distintas y

tienen distinta composición. Tal como lo menciona Quiroz y Fogliano (2018), los resultados de los valores a^* y b^* pueden verse afectados por la presencia y degradación de los polifenoles a flavonoides y melanoidinas (Cuadro 1).

Cuadro 1

Color según tipo de tostado.

Tostado	n	L \pm D.E.	a \pm D.E.	b \pm D.E.
CRUDO	9	26.5815 \pm 3.62 ^a	6.7585 \pm 1.66 ^b	6.3270 \pm 2.53 ^{ab}
LIGHT ROAST	9	24.7415 \pm 2.21 ^b	7.3059 \pm 2.16 ^{ab}	5.6219 \pm 2.51 ^{ab}
MEDIUM ROAST	9	24.5889 \pm 2.22 ^b	7.4544 \pm 2.05 ^{ab}	5.5289 \pm 2.46 ^b
DARK ROAST	9	25.3789 \pm 1.79 ^{ab}	8.0215 \pm 1.38 ^a	6.6581 \pm 1.63 ^a
CV		5.31	9.65	17.68
Probabilidad		<.0001	<.0001	<.0001

Nota. L=Luminosidad. a=eje verde-rojo. b= eje azul-amarillo. D.E.: Desviación Estándar. ^{ab}: Letras diferentes en cada columna indican

diferencias significativas ($P < 0.05$). CV: Coeficiente de Variación. n: Observaciones

Análisis de Color para Época de Cosecha

En el Cuadro 2, se observa que, en el valor L^* , octubre difiere de enero y junio ($P \leq 0.05$). Enero y junio no presentan diferencias entre sí ($P > 0.05$). Octubre presenta el valor más claro de las tres épocas de cosecha (28.24). Para los valores a^* y b^* , los tres meses presentan diferencias entre sí ($P \leq 0.05$), octubre con los valores más altos, seguido de enero y por último junio. Se pudo inferir que junio, el cual presenta menor luminosidad que octubre y menor valor a^* y b^* que los otros dos meses, obtuvo estos resultados debido a que su contenido de polifenoles totales es mayor, como lo mencionan Quiroz y Fogliano (2018), que estos valores pueden verse afectados por la presencia y degradación de los polifenoles a flavonoides y melanoidinas, que es un factor que va relacionado con el color final. Así mismo, concuerda con lo concluido por Krysiak et al. (2013), donde mencionan que los componentes del color de los granos de cacao no han sido totalmente reconocidos, pero se asume que están asociados con los componentes polifenólicos y antocianinas, los cuales se policondensan en la fermentación.

Cuadro 2

Color según época de cosecha.

Época	N	L ± D.E.	a ± D.E.	b ± D.E.
ENERO	12	24.2603 ± 1.00 ^b	6.8003 ± 0.82 ^b	5.3286 ± 0.94 ^b
JUNIO	12	23.4597 ± 1.11 ^b	5.7656 ± 0.73 ^c	4.0600 ± 1.07 ^c
OCTUBRE	12	28.2481 ± 2.10 ^a	9.5894 ± 0.88 ^a	8.7133 ± 1.28 ^a
CV		5.31	9.65	17.68
Probabilidad		<.0001	<.0001	<.0001

Nota. L=Luminosidad, a=eje verde-rojo, b= eje azul-amarillo. D.E.: Desviación Estándar. ^{abc}: Letras diferentes en cada columna indican

diferencias significativas (P < 0.05). CV: Coeficiente de Variación. n: Observaciones.

Polifenoles Totales y Actividad Antioxidante***Análisis Folin-Ciocalteu y DPPH Según Tipo de Tostado***

En el Cuadro 3 se observa que no hay diferencias entre los granos crudos y el light roast (P > 0.05), pero estos difieren del medium y dark roast (P ≤ 0.05). Medium y dark difieren entre sí (P ≤ 0.05). El tostado de menor tiempo (light roast) presenta la concentración mayor, seguida de medium roast y dark roast. Esto demostró que a medida aumenta el tiempo de tostado, la concentración de polifenoles disminuye, exceptuando el light roast. Los resultados de disminución de polifenoles a mayor temperatura coinciden con lo descrito por Arlorio et al. (2008), quienes, atribuyen la pérdida de polifenoles por el efecto de la temperatura, debido a que ocurren reacciones de oxidación en los compuestos fenólicos, se polimerizan y forman compuestos insolubles de alto peso molecular. Otra de las atribuciones a la disminución de polifenoles es su reacción con proteínas para protegerlas. El light roast por otra parte, con una concentración similar de polifenoles totales a la del crudo, concuerda con los resultados obtenidos por Ioannone et al. (2015), donde se encontró la mayor cantidad de polifenoles totales en el tostado a menor temperatura. Esto lo atribuye al resultado del hidrolisis de polifenoles a unidades monoméricas más simples y a la formación de reductores y melanoidinas como consecuencia de reacciones de pardeamiento no enzimáticas.

El porcentaje de inhibición del DPPH demostró que todos los tipos de tostado presentan diferencias (P ≤ 0.05). La muestra cruda presenta el porcentaje más alto de inhibición, seguida del light roast y disminuyendo en los tostados con mayor temperatura (Anexo C). Se demostró que los granos

de cacao crudos tienen un porcentaje de inhibición más alto y por consiguiente una mayor actividad antioxidante, lo que coincide con la investigación realizada por Arlorio et al. (2008), donde los granos de cacao tostado tuvieron una actividad antioxidante más baja que la de los granos crudos. De los tres tipos de tostado, el porcentaje más alto de inhibición lo obtuvo el light roast, el cual es el tostado de menor temperatura, luego el medium roast y el más bajo el dark roast, el tostado de mayor temperatura. Los resultados de disminución de actividad antioxidante conforme la temperatura en el tipo de tostado incrementa, se compara con lo descrito por Summa et al. (2006), quienes analizaron que la actividad antioxidante disminuye progresivamente en el pre tostado y tostado. No obstante, difiere con los resultados obtenidos por Ioannone et al. (2015) en donde se observó un descenso de la actividad antioxidante en la primera etapa de tostado y luego un aumento en la etapa final debido a la formación de productos de la reacción de maillard. Sin embargo, Quiroz y Fogliano (2018) concluyeron que los granos crudos mantuvieron una actividad antioxidante mayor que las que pasaron por algún tipo de tostado, indicando que los compuestos generados durante el tostado no son significantes a la actividad antioxidante.

Cuadro 3

Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante según tipo de tostado.

Tostado	N	Polifenoles Totales (mg EAG/100 g) ± D.E.	% Inhibición ± D.E.
CRUDO	9	2614.32 ± 245.96 ^a	25.86 ± 10.08 ^a
LIGHT ROAST	9	2746.62 ± 189.66 ^a	19.29 ± 2.58 ^b
MEDIUM ROAST	9	2382.57 ± 284.46 ^b	16.46 ± 2.26 ^c
DARK ROAST	9	2115.96 ± 108.20 ^c	13.90 ± 3.76 ^d
CV		4.2789	5.0602
Probabilidad		<.0001	<.0001

Nota. D.E.: Desviación Estándar. ^{abcd}: Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (P < 0.05). CV: Coeficiente de

Variación. n: Observaciones. EAG: equivalentes de ácido gálico

Análisis Folin-Ciocalteu y DPPH según Época de Cosecha

En el Cuadro 4, se observa que hay una diferencia significativa en la concentración de polifenoles según la época de cosecha (P ≤ 0.05), siendo junio el mes con mayor concentración, seguido de enero y con la menor concentración, octubre. Estos resultados respaldan la información

obtenida por varias investigaciones (Counet et al. 2004; Cooper et al. 2007; Del Brunetto et al. 2007) donde especifican que la concentración de polifenoles totales es altamente dependiente de varios factores, como la región donde crecen los granos de cacao, su nivel de madurez, condiciones climáticas y las épocas de cosecha y almacenamiento. Esto demostró la importancia de los resultados obtenidos determinando la concentración de polifenoles totales en base a la época de cosecha, y concuerda con la investigación realizada por varios autores como Camu et al. (2008), donde se establece que muchos factores del ambiente, como lo es la exposición al sol, lluvia y tipo de suelo afectan la acumulación de polifenoles totales en las plantas. Así mismo, Niemenak et al. (2006) y Chang et al. (2009) concluyeron que la temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes también afectan la acumulación de polifenoles totales.

El porcentaje de inhibición del DPPH demostró que todas las épocas de cosecha presentan diferencias ($P \leq 0.05$). En el mes de junio se presentó la mayor actividad antioxidante ya que su porcentaje de inhibición fue el mayor, seguida de enero y con la menor, octubre (Anexo B). Esto demostró que la actividad antioxidante se ve afectada por la época de cosecha. Tal como lo menciona (Pascual et al. 2000), la concentración fenólica y sus propiedades se ven afectadas por factores como condiciones climáticas y agronómicas, así como la época de cosecha. Así mismo, cabe mencionar que en junio, la cual fue la época de cosecha con mayor cantidad de polifenoles totales, también fue la época con mayor actividad antioxidante, lo que concuerda con lo concluido por Oracz et al. (2015), donde se menciona que la actividad antioxidante va correlacionada con la concentración de polifenoles totales. No obstante, Arlorio et al. (2008) demostraron que no hay una correlación directa entre la cantidad de polifenoles totales y la actividad antioxidante, ya que esta se ve afectada por más factores como el origen y sus condiciones de crecimiento.

Cuadro 4

Contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante según época de cosecha.

Época	N	Polifenoles Totales (mg EAG/100 g) ±	
		D.E.	% Inhibición ± D.E.
ENERO	12	2459 ± 219.37 ^b	18.89 ± 2.35 ^b
JUNIO	12	2660.8 ± 349.85 ^a	23.51 ± 9.66 ^a
OCTUBRE	12	2274.81 ± 272.12 ^c	14.24 ± 3.48 ^c
CV		4.2789	5.0602
Probabilidad		<.0001	<.0001

Nota. D.E.: Desviación Estándar. ^{abc}: Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$). CV: Coeficiente de

Variación. n: Observaciones. EAG: equivalentes de ácido gálico

Análisis Folin-Ciocalteu y DPPH Según Tipo de Tostado y Época de Cosecha

Se observa en el Cuadro 5 que, para los granos sin tostar, la concentración de los polifenoles totales no demuestra diferencias entre la época de enero y junio ($P > 0.05$), siendo mayor que la del mes de octubre. En el light roast, la época de junio demuestra diferencias significativas con la concentración en enero y octubre ($P \leq 0.05$), siendo mayor que ambas. En el tipo de tostado medium roast, la concentración de polifenoles en las tres épocas de cosecha difiere entre sí ($P \leq 0.05$), teniendo la mayor concentración en junio, luego en enero y por último en octubre. En el dark roast, no se presentó diferencias entre las tres épocas de cosecha ($P > 0.05$), lo que se relaciona la pérdida de polifenoles totales a altas temperaturas. Con este cuadro se demostró que hay una interacción significativa entre la época de cosecha y el tipo de tostado utilizado en el procesamiento de los granos de cacao, respaldado por los resultados de los dos cuadros anteriores y comparados con los obtenidos en investigaciones similares.

Cuadro 5

Contenido de polifenoles totales según tipo de tostado y época de cosecha.

Mes	N	Polifenoles Totales (mg EAG/100 g) Tostado-Época			
		Crudo ± D.E.	Light Roast ± D.E.	Medium Roast ± D.E.	Dark Roast ± D.E. (N.S.)
Enero	12	2660.9±158.75 ^a	2617.15±79.46 ^b	2359.72±91.49 ^b	2198.22±96.60
Junio	12	2833.41±155.65 ^a	2972.27±78.29 ^a	2711.29±105.04 ^a	2126.21±95.19
Octubre	12	2348.65±106.88 ^b	2650.43±126.66 ^b	2076.71±32.60 ^c	2023.45±72.76
Probabilidad		<.0001	0.0004	<.0001	0.0536
CV			4.2789		

Nota. D.E.: Desviación Estándar. N.S.: No Significante. ^{abc}: Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

CV: Coeficiente de Variación. n: Observaciones

En el Cuadro 6, se observa que se encontraron diferencias dependiendo de la época de cosecha ($P \leq 0.05$) en la actividad antioxidante determinada por el porcentaje de inhibición en los granos de cacao crudos. La época de junio presenta una mayor actividad antioxidante, seguida de enero y por último octubre (Anexo D). En el light roast, se encontró diferencias en la época de junio en comparación de la de enero y octubre ($P \leq 0.05$), presentando la mayor actividad antioxidante. En el medium y dark roast, no se observó diferencias en el porcentaje de inhibición entre las épocas de enero y junio ($P > 0.05$), siendo significativamente mayor que la de octubre ($P \leq 0.05$). Se demostró la interacción significativa entre la época de cosecha y tipo de tostado para determinar la actividad antioxidante, reforzando que estas dos variables afectan la misma, tal como descrito en otras investigaciones similares.

Cuadro 6

Actividad antioxidante según tipo de tostado y época de cosecha.

Mes	N	% Inhibición Tostado-Época			
		CRUDO ± D.E.	LIGHT ROAST ± D.E.	MEDIUM ROAST ± D.E.	DARK ROAST ± D.E.
Enero	12	22.21±1.42 ^b	17.80±1.20 ^b	18.912±0.55 ^a	16.65±0.82 ^a
Junio	12	38.84±1.26 ^a	22.56±0.59 ^a	16.61±0.54 ^a	16.04±1.41 ^a
Octubre	12	16.54±0.49 ^c	17.52±0.87 ^b	13.86±0.71 ^b	9.02±0.39 ^b
Probabilidad		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
CV				5.0602	

Nota. ^{abc}: Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$). N: Observaciones. CV: Coeficiente de Variación,

Conclusiones

En la época de cosecha de junio los granos de cacao tienen la mayor cantidad de polifenoles totales y actividad antioxidante, seguida de enero y con la menor cantidad en octubre.

La cantidad de polifenoles totales de los granos de cacao varía dependiendo del tipo de tostado, siendo el light roast el tostado donde más cantidad se encuentran, similar a la de los granos crudos y disminuyendo en los tostados con mayor temperatura.

La actividad antioxidante medida por el porcentaje de inhibición es mayor en los granos de cacao crudos, seguida del light roast y disminuyendo a medida que la temperatura de tostado incrementa.

El color de los granos de cacao se ve afectado por el tipo de tostado y época de cosecha.

Recomendaciones

Elaborar barras de chocolate con los mismos granos de cacao ya tostados a diferentes temperaturas, medir su cantidad y capacidad antioxidante para analizar su efecto en el procesamiento completo del cacao y realizar el respectivo análisis sensorial.

Realizar un análisis proximal a las muestras de cacao crudo de las tres épocas de cosecha para analizar de qué otra manera este parámetro afecta las propiedades nutricionales de los granos de cacao.

Identificar cuáles y en qué porcentaje se encuentran los flavonoides (catequinas y (-)-epicatequinas; y procianidinas) específicos en el cacao usando sus equivalentes como patrón estándar en vez de ácido gálico.

Realizar un análisis climatológico y de suelo en las áreas de cosecha en cada una de las épocas de cosecha para determinar qué parámetros se necesitan para obtener granos de cacao con mayor cantidad y actividad antioxidante.

Determinar la actividad antioxidante de otros compuestos bioactivos del cacao, como los alcaloides.

Referencias

- Arlorio M, Locatelli M, Travaglia F, Coisson J-D, Del Grosso E, Minassi A, Appendino G, 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 Chemistry*. 106(3):967–975. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.009.
- Camu N, Winter T de, Addo SK, Takrama JS, Bernaert H, Vuyst L de. 2008. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88(13):2288–2297. doi:10.1002/jsfa.3349.
- Chang J, Luo J, He G. 2009. Regulation of polyphenols accumulation by combined overexpression/silencing key enzymes of phenylpropanoid pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 41(2):123–130. eng. doi:10.1093/abbs/gmn014.
- Cooper KA, Campos-Giménez E, Jiménez Alvarez D, Nagy K, Donovan JL, Williamson G. 2007. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *J Agric Food Chem*. 55(8):2841–2847. eng. doi:10.1021/jf063277c.
- Counet C, Ouwerx C, Rosoux D, Collin S. 2004. Relationship between procyanidin and flavor contents of cocoa liquors from different origins. *J Agric Food Chem*. 52(20):6243–6249. eng. doi:10.1021/jf040105b.
- Darré M. 2019. Factores de pre y poscosecha que afectan el contenido de compuestos antioxidantes en hortalizas [Tesis]. Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- Del Brunetto MR, Gutiérrez L, Delgado Y, Galignani M, Zambrano A, Gómez Á, Ramos G, Romero C. 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*. 100(2):459–467. doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.007.

- Dreosti IE. 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*. 16(7-8):692–694. doi:10.1016/s0899-9007(00)00304-x.
- Flores MdlA, Víquez-Rodríguez J, Rodríguez Sánchez JC. 2016. Efectividad del *Theobroma cacao* L sobre el desarrollo del biofilm dental. *Revista Científica Odontológica*; [consultado el 7 de feb. de 2021]. 12(1). <https://revistaodontologica.colegiodontistas.org/index.php/revista/article/view/303/422>.
- García Martínez EM, Fernández Segovia I, Fuentes López A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. España: Universitat Politècnica de València. Español. <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>.
- Guija E, Inocente Camones MÁ, Ponce Pardo J, Zarzosa Norabuena E. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*; [consultado el 8 de abr. de 2021]. 15(1):57–60. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S1727-558X2015000100008&lng=es&tlng=es.
- Hong Y-J, Barrett DM, Mitchell AE. 2004. Liquid chromatography/mass spectrometry investigation of the impact of thermal processing and storage on peach procyanidins. *J Agric Food Chem*. 52(8):2366–2371. eng. doi:10.1021/jf0306082.
- Ioannone F, Di Mattia CD, Gregorio M de, Sergi M, Serafini M, Sacchetti G. 2015. Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing. *Food Chemistry*. 174:256–262. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.019.
- Krysiak W. 2006. Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *Journal of Food Engineering*. 77(3):449–453. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.07.013.
- Krysiak W, Adamski R, Żyżelewicz D. 2013. Factors Affecting the Color of Roasted Cocoa Bean. *J Food Qual*. 36(1):21–31. doi:10.1111/JFQ.12009.

- Martinez L. 2019. Evaluación del efecto del clarificado y filtrado en las características fisicoquímicas de néctar de marañón (*Anacardium occidentale*) [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. ES;EN;FR;español;Spanish;French;spa. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6570/1/AGI-2019-T037.pdf>.
- Niemenak N, Rohsius C, Elwers S, Omokolo Ndoumou D, Lieberei R. 2006. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(6-7):612–619. doi:10.1016/j.jfca.2005.02.006.
- Oracz J, Zyzelewicz D, Nebesny E. 2015. The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region, and processing operations: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 55(9):1176–1192. eng. doi:10.1080/10408398.2012.686934.
- Ordoñez E, Leon Arevalo A, Rivera Rojas H, Vargas E. 2019. Quantification of total polyphenols and antioxidant capacity in skins and seeds from cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), grape (*Vitis Vinífera*) and uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*. 10(2):175–183. doi:10.17268/sci.agropecu.2019.02.02.
- Ortiz L, Graziani de Fariñas L, Rovedas L G. 2009. Influencia de varios factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical*; [consultado el 7 de abr. de 2021]. 59(2):119–127. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S0002-192X2009000200001&lng=es&tlng=es.
- Pascual T, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem*. 48(11):5331–5337. eng. doi:10.1021/jf000549h.
- Plúa JC. 2008. Diseño de una Línea Procesadora de Pasta de Cacao Artesanal [Tesis]. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral; [consultado el 20 de nov. de 2020]. https://www.academia.edu/14308465/Dise%C3%B1o_de_una_L%C3%ADnea_Procesadora_de_Pasta_de_Cacao_Artesanal.

- Priftis A, Stagos D, Konstantinopoulos K, Tsitsimpikou C, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Tzatzarakis MN, Kouretas D. 2015. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol Med Rep.* 12(5):7293–7302. eng. doi:10.3892/mmr.2015.4377.
- Quiroz C, Fogliano V. 2018. Design cocoa processing towards healthy cocoa products: The role of phenolics and melanoidins. *Journal of Functional Foods.* 45:480–490. doi:10.1016/j.jff.2018.04.031.
- Ramírez JH, García Flores CF, Vizcaíno Reséndiz JA, Cárdenas JM, Gutiérrez Cantú FJ, Murga HM, Villagrán Rueda S. 2012. ¿Qué son y para qué sirven los antioxidantes? La ciencia y el hombre; [consultado el 7 de nov. de 2020]. 25(2). <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num2/articulos/antioxidantes/>.
- Suazo Mercado YS. 2012. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense [Tesis]. Pamplona: Universidad Pública de Navarra. spa.
- Summa C, Raposo FC, McCourt J, Lo Scalzo R, Wagner K-H, Elmadfa I, Anklam E. 2006. Effect of roasting on the radical scavenging activity of cocoa beans. *European Food Research and Technology.* 222(3-4):368–375. doi:10.1007/s00217-005-0005-2.
- Żyżelewicz D, Budryn G, Krysiak W, Oracz J, Nebesny E, Bojczuk M. 2014. Influence of roasting conditions on fatty acid composition and oxidative changes of cocoa butter extracted from cocoa bean of Forastero variety cultivated in Togo. *Food Research International.* 63:328–343. doi:10.1016/j.foodres.2014.04.053.

Anexos

Anexo A

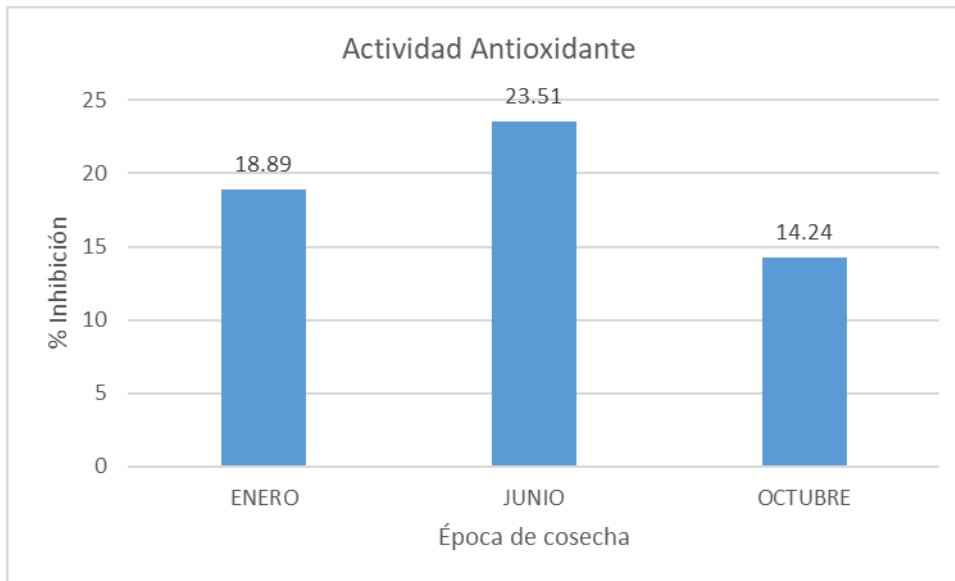
Minutos de tostado para tipo de tostado y época de cosecha.

ÉPOCA	N	TOSTADO		
		LIGHT \pm D.E.	MEDIUM \pm D.E.	DARK \pm D.E.
ENERO	9	14 \pm 0 ^a	20 \pm 0 ^a	30 \pm 0 ^a
JUNIO	9	12 \pm 4.36 ^{ab}	15 \pm 0 ^b	20 \pm 0 ^b
OCTUBRE	9	10 \pm 0 ^b	15 \pm 0 ^b	20 \pm 0 ^b
Probabilidad		0.0039	0.0007	<.0001
C.V.		8.382498		

Nota. C.V.: Coeficiente de variación. D.E.: Desviación estándar. ^{ab}: Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (P<0.05). n: Observaciones

Anexo B

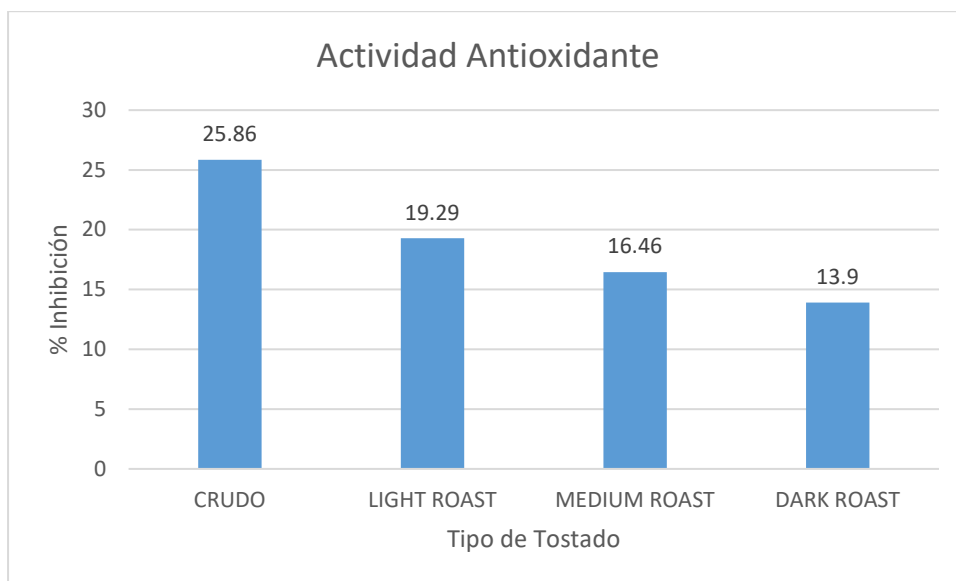
Actividad antioxidante según época de cosecha.



Nota. Actividad antioxidante de las muestras secas molidas a 50 mg/ml, evaluadas por el método DPPH a 100uM (Curva estándar de 100 a 600 ppm con ácido gálico como referencia).

Anexo C

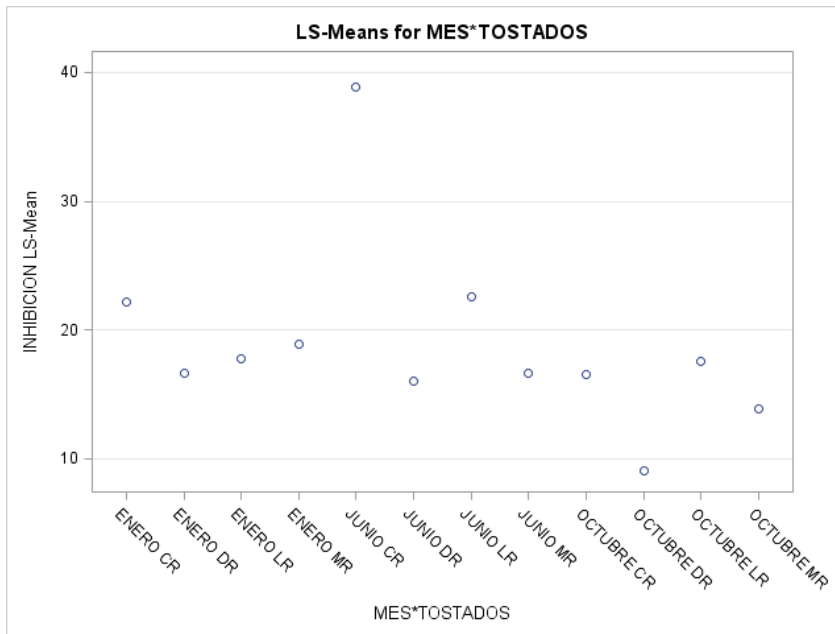
Actividad antioxidante según tipo de tostado



Anexo C. Actividad antioxidante de las muestras secas molidas a 50 mg/ml, evaluadas por el método DPPH a 100uM (Curva estándar de 100 a 600 ppm con ácido gálico como referencia).

Anexo D

Actividad antioxidante según tipo de tostado y época de cosecha.



Anexo D. Actividad antioxidante de las muestras secas molidas a 50 mg/ml, evaluadas por el método DPPH a 100uM (Curva estándar de 100 a 600 ppm con ácido gálico como referencia).