

Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en chocolates comerciales venezolanos

Antioxidant activity and polyphenol content in Venezuelan commercial chocolates

V. Fernández¹, A. Yee², B. Sulbarán¹ y J. Peña¹

¹Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Alimentos. Maracaibo, Venezuela. 4012.

²Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química. Maracaibo, Venezuela.

Resumen

Los chocolates constituyen una importante fuente de polifenoles en la dieta, en los últimos años numerosos estudios han indicado que los polifenoles presentan propiedades beneficiosas para el control de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y las derivadas del estrés celular, particularmente algunos tipos de cáncer. En esta investigación, se determinaron las características químicas humedad, grasa y cenizas así como el contenido de polifenoles y actividad antioxidante de muestras de chocolate blanco, leche y oscuro (45% y 70% de cacao) de origen venezolano. Las características químicas fueron evaluadas conforme a lo establecido por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). El contenido de polifenoles totales fue determinado empleando el método Folin Ciocalteu y la actividad antioxidante fue evaluada por el método de decoloración del catión radical 2,2'-azino-bis- 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS^{•+}). La humedad en las muestras oscilo entre 2,41-1,23%; el contenido de grasa (g.100g⁻¹) se encontró en el rango de 39- 27,10, siendo el chocolate blanco el que presentó el mayor contenido de grasas. El contenido de cenizas fue mayor a 3% en todos los casos, el chocolate con leche presento el menor contenido de cenizas. El contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de los chocolates fue mayor a medida que se incremento el contenido de sólidos de cacao presente en el mismo indicativo de las importantes propiedades funcionales de este constituyente en el chocolate.

Palabras clave: chocolates, características químicas, compuestos funcionales.

Abstract

The chocolates are important source of polyphenols in the human diet; in recent years several researches have indicated that polyphenols have beneficial properties for the control of cardiovascular, inflammatory and cell stress particularly related to some types of cancer. This research determined the chemical moisture, fat and ash and the content of polyphenols and antioxidant activity of samples of white chocolate, milk and dark (45% and 70% cocoa) from Venezuela. The chemical characteristics were evaluated as provided by the Venezuelan Commission for Industrial Standards (COVENIN). The total polyphenol content was determined by the Folin Ciocalteu and antioxidant activity was evaluated by the bleaching method of the radical cation 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS^{•+}). Moisture in the samples ranged from 2.41 to 1.23% fat content (g.100g⁻¹) was found in the range from 39 to 27.10, with white chocolate which had the highest content of fats. The ash content was higher at 3% in all cases; milk chocolate had the lowest ash content. The polyphenol content and antioxidant activity of chocolates was higher at the time that the content of solids cocoa increased which is an indicative of the important functional properties of this constituent in chocolate.

Key word: chocolate, polyphenols, antioxidants.

Introducción

Chocolate es el producto obtenido de la mezcla homogénea de cantidades de licor de cacao (pasta cacao), manteca de cacao, con la adición o no de azúcares, edulcorantes, sólidos de leche (con excepción del suero de leche), grasa vegetal hasta un 5% y los aditivos alimentarios permitidos por las autoridades sanitarias competentes (COVENIN 52, 1999). Desde un punto de vista tecnológico el proceso de transformación del cacao a chocolate involucra las siguientes etapas: (1) Cosecha y desgrana (2) Secado y limpieza (3) Descascarillado (4) Prefermentación y Fermentación, (2) Secado, (3) Producción de la pasta de cacao (4) Obtención de la manteca de cacao y licor de cacao (5) Licuado (6) Refinado (7) Molienda y (8)

Introduction

Chocolate is the product obtained from the homogeneous quantities mix of cacao liquor (cacao paste), cacao butter, with or without sugar, sweeteners, milk solids (excepting whey milk), vegetal fat until 5% and the food additives allows by the competent sanitary authorities (COVENIN 52, 1999). From the technological point of view, the transformation process of cacao to chocolate involves the following phases: (1) harvest and shattering (2) dry and clean-up process (3) husking (4) Pre-fermentation and fermentation, (2) dry process, (3) production of cacao paste (4) obtaining of the cacao butter and cacao liquor (5) blending (6) Refining process (7) grinding and (8) mixing process (conchado) and tempering (Prabhakaran, 2001).

Conchado y temperado (Prabhakaran, 2001).

El chocolate es consumido en todo el mundo, en todos los segmentos de la sociedad y personas de todas las edades, investigaciones recientes han demostrado que el consumo de productos de cacao y sus derivados contribuyen a la salud humana debido a que constituyen una importante fuente de lípidos, azúcares, minerales (potasio, magnesio, cobre y hierro) y compuestos antioxidantes, principalmente polifenoles del tipo flavonoides poliméricos, catequinas y procianidinas, algunos formados durante el procesamiento del grano de cacao (Shahidi *et al.*, 1994; Waterhouse *et al.*, 1996; Belščik *et al.*, 2009). Estos polifenoles, no solo determinan importantes propiedades organolépticas del chocolate como el amargor final (principalmente debido a la cafeína y teobromina) y el sabor a miel y nuez (Jeanjean 1995) sino que también han demostrado tener efectos protectores contra diversas enfermedades e importantes efectos analgésicos (Keen *et al.*, 2005; Kris-Etherton y Keen, 2002; Steinberg *et al.*, 2003), el consumo de chocolate se ha convertido en un importante medio para reducir el riesgo de padecimiento de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer debido principalmente a su capacidad de controlar reacciones de oxidación que puedan ocasionar daño a nivel celular (Heiss *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003), incluso algunos autores han reportado que esta actividad antioxidante en los chocolates es igual o mayor a la de algunas frutas y vegetales (Lee *et al.*, 2003).

Chocolate is eaten worldwide, by all segments of the society and people of all age, recent researches have proved that the consumption of cacao products contribute to the human's health, since these constitute an important source of lipids, sugar, minerals (potassium, magnesium, copper and iron) and antioxidant components, mainly polyphenols such as polymeric flavonoids, catechins and procyanidin, some formed while processing the cacao grain (Shahidi *et al.*, 1994; Waterhouse *et al.*, 1996; Belščik *et al.*, 2009). These polyphenols do not only determine important organoleptic properties of chocolate, as the final bitterness (mainly due to the caffeine and theobromine) and the honey and nut taste (Jeanjean 1995) but these also have protecting effects against different diseases and important analgesic effects (Keen *et al.*, 2005; Kris-Etherton and Keen, 2002; Steinberg *et al.*, 2003), the consumption of chocolate has become very important for reducing the risk of having heart diseases and some types of cancer, mainly due to its capacity for controlling oxidation reactions that could cause damage in the cells (Heiss *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003), some authors have even reported that this antioxidant activity in chocolates is equal or higher to those seen in some fruits and vegetables (Lee *et al.*, 2003). Recent estimations of the contributions that chocolate offers to the daily consumption of antioxidants indicate that 41 grams of milk chocolate might contain a similar quantity of the polyphenols content of a standard red wine measure (140ml or 1.5 oz aprox) and a hot chocolate cup might

Recientes estimaciones de la contribución que puede hacer el chocolate a la ingesta diaria de antioxidantes indican que 41 gramos de chocolate de leche pueden contener una cantidad similar al contenido de polifenoles de un servicio estándar de vino tinto (140mL ó 1,5oz aprox) y una taza de chocolate caliente puede proporcionar el doble o triple de esa cantidad (Dreosti, 2000). Adicionalmente, el alto contenido de flavonoides presentes en el chocolate, evitan el ranciamiento de las grasas, con lo cual disminuye la necesidad de agregar aditivos para la preservación (Waterhouse *et al.*, 1996).

Basados en estos hechos, en el presente estudio se evaluó el contenido de polifenoles y actividad antioxidante de diferentes chocolates comerciales venezolanos a fin de establecer el posible efecto funcional de estos productos, los cuales forman parte importante de la dieta de la población.

Parte experimental

Muestras

Se analizaron cuatro tipos diferentes de chocolates: Chocolate Blanco (CB) (34% de manteca de cacao); chocolate con leche (CL) (41% de cacao); chocolate oscuro 45% de cacao (CO_{45%}) y chocolate oscuro 70% de cacao (CO_{70%}) correspondientes a una misma empresa chocolatera venezolana de amplia distribución. Los chocolates fueron adquiridos en abastecimientos comerciales de la ciudad de Maracaibo- estado Zulia, todos los chocolates correspondían a un mismo lote de elaboración, muestreándose un total de seis unidades de 80 gramos para

provide the double or triple of that quantity (Dreosti, 2000). Additionally, the high content of flavonoids present in chocolate avoids fats to turn rancid, which reduces the need of adding preservation additive (Waterhouse *et al.*, 1996).

Based on the latter, the main objective of this research was to evaluate the polyphenol content and the antioxidant activity of different commercial Venezuelan chocolate with the aim of establishing the possible functional effect of these products, which are important aspects of the diet's population.

Materials and methods

Samples

Four different types of chocolates were analyzed: white chocolate (WC) (34% of cacao butter); milk chocolate (MC) (41% of cacao); dark chocolate 45% of cacao (CO_{45%}) and dark chocolate 70% of cacao (CO_{70%}) corresponding to the same wide distribution Venezuelan Chocolate Enterprise.

Chocolates were acquired in commercial stores of Maracaibo city – Zulia state, all chocolates corresponded to the same elaboration lot, sampling a total of six units of 80 grams for each type of chocolate (Camara *et al.*, 2009; COVENIN 1338).

Physical-chemical characterization of chocolates

An agreement established by the Venezuelan Industrial Norms Commission (COVENIN) was performed. The physical-chemical parameters evaluated were: humidity (COVENIN 374); (COVENIN 430); %

cada tipo de chocolate (Camara *et al.*, 2009; COVENIN 1338).

Caracterización fisicoquímica de los chocolates

Se realizó de acuerdo a lo establecido por las Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron: humedad (COVENIN 374); (COVENIN 430), % cenizas (COVENIN 479) y porcentaje grasa (COVENIN 1726). Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

Preparación de la muestra

La preparación de las muestras de chocolate se realizó de acuerdo a lo descrito por Belščík *et al.* (2009). Los chocolates fueron congelados y manualmente troceados, a fin de eliminar los lípidos de las muestras, 2 gramos de cada tipo de chocolate fue desgrasado con 10 mL de hexano, el chocolate desgrasado fue secado al aire durante 24h para remover el residuo de solvente orgánico. Los compuestos fenólicos fueron extraídos dos veces, a partir de 1 gramo de muestra desgrasada con 2,5 mL de una solución acuosa de metanol (Riedel Haën, Alemania) al 70%, por 30 minutos en un baño ultrasónico. Después de cada extracción los residuos fueron centrifugados durante 10 min a 3000rpm y los sobrenadante fueron decantados en un balón de 5mL. El balón con el extracto se almacenó en un congelador a -5°C hasta su análisis. Los extractos fueron empleados para determinar la actividad antioxidante y contenido de polifenoles en las muestras.

Determinación del contenido total de polifenoles y actividad antioxidante

El contenido de polifenoles totales se realizó de acuerdo a lo descrito

ashes (COVENIN 479) and fat percentage (COVENIN 1726). All measures were carried out by triplicate.

Preparation of the sample

The preparation of chocolate samples was performed according to what Belščík *et al.* (2009) described. All chocolates were frozen and cut manually with the aim of eliminating the lipids from samples, 2 grams of each type of chocolate were defatted with 10 mL of hexane, and the defatted chocolate was let dried in the air for 24 hours to remove the residue of the organic solvent.

The phenolic compounds were extracted twice, after 1 gram of the defatted sample with 2.5 mL of a methanol aqueous solution (Riedel Haën, Germany) at 70% for 30 minutes in an ultrasonic bath. After each extraction, the residues were centrifuged for 10 min at 3000 rpm and the supernatants were decanted in a 5 mL balloon. The balloon with the extract was stored in a freezer at -5°C until its analysis. The extracts were employed for determining the antioxidant activity and the polyphenols content in the samples.

Determination of the total polyphenol content and the antioxidant activity

The total polyphenols content was determined according to the description provided by Abbe and Isamil (2010), for which 100 µL of the extract previously diluted was added to 750 µL of the diluted Folin-Ciocalteu reactive (1:10% v/v). The mix was stored in the dark, and once passed 5 min, 750 µL de Na₂CO₃ were added at 6% m/v. The sample was stored in the dark for 90 min and the absorbance

por Abbe y Isamil (2010), para lo cual 100 μL de extracto adecuadamente diluido se adicionan 750 μL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido (1:10%v/v). La mezcla se almacenó en la oscuridad y transcurridos 5min se adicionan 750 μL de Na_2CO_3 al 6% m/v. La muestra fue almacenada en la oscuridad durante 90min y se midió la absorbancia a 750nm empleando un espectrómetro UV-Visible. La curva de calibración se preparó de la misma manera que las muestras empleando ácido gálico (Riedel Haën, Alemania) como estándar de referencia en un rango de concentración de 100-1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE) $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

La actividad antioxidante total de las muestras se evaluó por el método ABTS reportado por Miller *et al.* (1996) y Riece- Evans *et al.* (1996) empleando TROLOX (Sigma Aldrich, St. Louis, Mi, USA) como estándar de referencia. La generación química del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se realizó a partir de la reacción de una solución de ABTS (Sigma, St. Louis, Mi, USA) 7 mM con persulfato potásico (Grado analítico, JT Baker, España) 2,5 mM, ambos reactivos en una proporción de 1:1%v/v. Esta mezcla se dejó en reposo, tapada con papel aluminio y temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) durante un tiempo mínimo de 16 horas antes de comenzar las evaluaciones. Una vez formado el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, se diluyó hasta alcanzar una absorbancia de 0,6- 0,7 a 750 nm (longitud de onda de máxima absorción), lo cual se logró mezclando aproximadamente 160 μL de la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y 3000 μL de etanol puro (grado HPLC, Merck, Darmstadt, Germany) (Kuskoski *et*

was measured at 750 nm, using an UV-visible spectrometer. The calibration curve was prepared the same way as the samples, using galic acid (Riedel Haën, Germany) as a reference standard, in a 100-1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration rank. The results were expressed as equivalents of galic acid (GAE) $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

The total antioxidant activity of the samples was evaluated using the ABTS method reported by Miller *et al.* (1996) and Riece-Evans *et al.* (1996), using TROLOX (Sigma Aldrich, St. Louis, Mi, USA) as a reference standard. The chemical generation of the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical was carried out after the reaction of an ABTS solution (Sigma, St. Louis, Mi, USA) 7 mM with potassium persulphate (analytical degree, JT Baker, Spain) 2.5 mM, both reactives in 1:1% vv proportion.

This mix was left aside, covered with foil paper and environment temperature ($\pm 25^\circ\text{C}$) during a minimum time of 16 hours before evaluating. Once formed the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical, it diluted until reaching an absorbance of 0.6- 0.7 to 750 nm (wave longitude of maximum absorption), which was achieved mixing approximately 160 μL of the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ solution and 3000 μL of pure ethanol (HPLC degree, Merck, Darmstadt, Germany) (Kuskoski *et al.*, 2005; Vit *et al.*, 2008).

The radical generated was steady for a maximum period of 24 h, after this time, the absorbance reduced progressively and the radical could not be employed for the analysis. To the generated radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was determined the absorbance at 750 nm

al., 2005; Vit *et al.*, 2008). El radical generado fue estable por un periodo máximo de 24 h, luego de este tiempo la absorbancia decae progresivamente y el radical no puede ser empleado para el análisis. Al radical ABTS•+ generado se le determinó la absorbancia a 750nm (Abs Cromóforo radical, t_{0min}), se añadieron 40 μ L de la muestra del extracto previamente diluido y se midió nuevamente la absorbancia a 750 nm transcurridos 5 min (Abs. Cromóforo radical + antioxidante, t_{5min}).

La actividad antioxidante total (AAT) de las muestras se determinó de acuerdo a la ecuación:

$$AAT: (\text{Abs Cromóforo radical}) t_{0min} - (\text{Abs Cromóforo radical} + \text{antioxidante}) t_{5min}$$

Análisis y modelo estadístico

El modelo estadístico empleado en la investigación fue totalmente aleatorizado con un diseño de mediciones repetidas. Todos los análisis fueron realizados por triplicado. La existencia de diferencias significativas entre cada uno de los parámetros estudiados fue verificada mediante el Test de comparaciones múltiples de Duncan ($P < 0,05$) para lo cual se empleó el paquete estadístico computarizado SAS versión 9.1.3 (SAS 2001).

Resultados y discusión

Caracterización química de los chocolates.

Los resultados de la caracterización química de los chocolates se muestran en el cuadro 1. Se observó que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) para cada uno de los parámetros evaluados en los diferentes chocolates analizados, excepto para

(radical abts chromophore, t_{0min}), 40 μ L were added to the sample of the extract previously diluted, and after 5 min the absorbance was measured again at 750 nm (radical abts chromophore + antioxidants, t_{5min}).

The total antioxidant activity (TAA) of the samples was determined according to this equation:

$$TAA: (\text{radical abts chromophore}) t_{0min} - (\text{radical abts chromophore} + \text{antioxidants}) t_{5min}$$

Statistical model and analysis

The statistical model employed in the current research was completely at random with repeated replications. All the analyses were carried out by triplicate. The existence of significant differences among each of the studied parameters was verified using Duncan multiple comparison Test ($P < 0.05$), using the statistical software SAS, version 9.1.3 (SAS 2001).

Results and discussion

Chemical characterization of chocolates

The results of the chemical characterization of chocolates are shown on table 1. It was observed that there are significant differences ($P < 0.05$) for each of the parameters evaluated in the different chocolates analyzed, excepting for the humidity, which did not vary significantly for milk chocolate and white chocolate. The humidity content of each of the analyzed samples was higher than 1.5%, mentioned as maximum value allowed by COVENIN (norm 52:1999). The results are on the rank from 2.3 to 1.4, mentioned by Mella *et al.* (1987) in Chilean commercial chocolate

Cuadro 1. Análisis fisicoquímicos de chocolates estudiados.**Table 1. Phyto-chemical analysis of the studied chocolates.**

Tipo de chocolate	Parámetro		
	%Humedad	Grasas (g.100g ⁻¹)	Cenizas (mg.100g ⁻¹)
CB	2,45±0,05 ^a	39,00±1,62 ^a	3,48±0,01 ^b
CL	2,41±0,04 ^a	37,62±0,51 ^c	3,31±0,25 ^c
CO _{45%}	1,23±0,01 ^c	27,10±2,25 ^d	3,06±0,19 ^d
CO _{70%}	1,72±0,05 ^b	38,75±2,80 ^b	4,20±0,14 ^a

^{a, b, c y d} Índices de Duncan. (P<0,05). Análisis aplicados por separado a cada uno una de las variables estudiadas y a cada tipo de chocolate analizado.

la humedad la cual no vario significativamente para el chocolate con leche y chocolate blanco. El contenido de humedad de cada una de las muestras analizadas fue superior al 1,5% señalado como máximo permisible por COVENIN (norma 52:1999). Los resultados se encuentran en el rango de 2,3- 1,4% señalado por Mella *et al.* (1987) en muestras de chocolates comerciales de origen chileno y los reportados por Pons (2010) en muestras de chocolate mexicano quien indica un rango de humedad de 0,32-4,78%.

El mayor contenido de grasas en las muestras analizadas correspondió al chocolate blanco con un promedio de 39 g.100g⁻¹, este resultado es inferior al valor promedio de 35 g.100g⁻¹ indicado por Mursu *et al.* (2004) para chocolates blancos comerciales finlandeses, el autor también señala un contenido de grasas de 33 g.100g⁻¹ para chocolates oscuros el cual es inferior al determinado en este estudio para chocolate CO_{70%} pero superior al obtenido para el chocolate oscuro (45%

sample, and by those reported by Pons (2010) in Mexican chocolate samples, this author indicates a humidity rank from 0.32 to 4.78%.

The highest fat content in the analyzed samples corresponded to white chocolate with an average of 39 g.100g⁻¹, this result is lower than the average value of 35 g.100g⁻¹ indicated by Mursu *et al.* (2004) for Finland commercial white chocolate, this author also mention a fat content of 33 g.100g⁻¹ for dark chocolate, which is inferior than the one determined in the current research for chocolate CO_{70%} but higher than the one obtained for dark chocolate (45% of cacao). The fat content in chocolate CO_{45%} was similar to the value of 27.1% and 42.1% reported by Pimentel *et al.* (2010) for Brazilian dark chocolate with 40% and 71% of cacao, respectively. Cidell and Alberts (2006) mention that the characteristics of a chocolate are based on the transformation suffered by the raw matter during the fabrication including the mix and proportion of ingredients used, such as percentage

de cacao). El contenido de grasas en los chocolate $CO_{45\%}$ fue similar al valor de 27,1% y 42,1% reportado por Pimentel *et al.* (2010) para chocolate oscuro de origen brasileño con 40% y 71% de cacao, respectivamente. Cidell y Alberts (2006) señalan que las características de un chocolate se basan en las transformaciones que sufre la materia prima durante la fabricación incluyendo mezcla y proporción de ingredientes utilizados tales como porcentaje de cacao o leche, por lo cual se infiere que las diferencias entre los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados por otros autores esta relacionada con el contenido de cacao empleado para la elaboración del chocolate. Es importante destacar que a pesar del alto contenido de grasa de los chocolates en estudios recientes, se ha indicado que el consumo de chocolates oscuros puede favorecer el incremento de lipoproteína de alta densidad (HDL) en la sangre disminuyendo, la posibilidad de accidentes cardiovasculares (Wan *et al.*, 2001; Mursu *et al.*, 2004).

El contenido de cenizas en todas las muestras analizadas fue superior al límite de 3 mg.100g⁻¹ establecido por COVENIN (Norma 52:1999). Ieggli *et al.* (2011) indican que los chocolates son una importante fuente de minerales en la dieta, sin embargo, su contenido depende del tipo y condiciones de procesamiento empleadas para su fabricación.

Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los chocolates.

Los resultados correspondientes al contenido de polifenoles y actividad antioxidante para los chocolates analizados se muestran en el cuadro 2.

of cacao or milk, thus is inferred that the differences of the results of this research and the ones reported by other authors are related to the content of cacao employed for elaborating the chocolate.

It is important to mention that in spite of the high fat content of chocolates in recent researches, it has been mentioned that the consumption of dark chocolate favor the increment of high density lipoproteins (HDL) in the blood, reducing the possibility of cardiovascular diseases (Wan *et al.*, 2001; Mursu *et al.*, 2004).

The ashes content in all the analyzed samples was superior to the limit of 3 mg.100g⁻¹ established by COVENIN (Norm 52:1999). Ieggli *et al.* (2011) indicate that chocolates are a very important source of minerals in the diet; however, its content depends on the type of processing conditions employed for its fabrication.

Polyphenol content and antioxidant activity of chocolates

The results correspondent to the polyphenol content and the antioxidant activity for the analyzed chocolates are shown on table 2.

The polyphenols content in the samples analyzed differed significantly ($P < 0.05$) for each type of the studied chocolates, a similar behavior reported by Belščik *et al.* (2009) who analyzed different types of chocolates, including white, milk and dark chocolate, and determined that the polyphenols content depends on the solids content of cacao in the product.

The highest polyphenols content was presented by dark chocolate with 70% of cacao, which can be attributed to the solids content of

Cuadro 2. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los chocolates.**Table 2. Polyphenols content and antioxidant activity of chocolates.**

Tipo de chocolate	Parámetro		
	Contenido de polifenoles totales (mg GAE · 100g ⁻¹)	Actividad antioxidante	
		mm Trolox.L ⁻¹	μmol Trolox.g ⁻¹ *
CB	441,01±0,05 ^d	0,62 ^d	0,023±1,62 ^d
CL	8965,05±0,04 ^c	57,36 ^c	1,93±0,51 ^c
CO _{45%}	10148,00±0,01 ^b	98,00 ^b	3,06±2,25 ^b
CO _{70%}	15230,04±0,05 ^a	111,35 ^a	3,95±2,80 ^a

a, b, c y d Índices de Duncan. (P<0,05). Análisis aplicados por separado a cada uno de las variables estudiadas y a cada tipo de chocolate analizado.

*Valores obtenidos a partir de la masa original de chocolate.

El contenido de polifenoles en las muestras analizadas difirió significativamente (P<0,05) para cada uno de los tipos de chocolates estudiados, un comportamiento similar al reportado por BelščIk *et al.* (2009) quienes analizaron diferentes tipos de chocolates, incluidos blancos, chocolates de leche y oscuros y determinaron que el contenido de polifenoles depende del contenido de sólidos de cacao en el producto.

El mayor contenido de polifenoles lo presentó el chocolate oscuro con 70% de cacao, lo cual puede ser atribuido al contenido de sólidos de cacao en la formulación (Pimentel *et al.*, 2010). Las diferencias entre el contenido de polifenoles en chocolate de leche y chocolates oscuros se puede atribuir al hecho de que los mismos son de naturaleza hidrofílica, por lo que se encuentran en la fracción no grasa del chocolate (Miller *et al.*, 2006).

cacao in the formula (Pimentel *et al.*, 2010). The differences between the polyphenols content in milk chocolate and dark chocolates might be attributed with the fact that these have a hydrophilic nature, found on the defatted fraction of the chocolate (Miller *et al.*, 2006).

White chocolate presented the lowest polyphenols content, even though these do not contain solids of cacao in the formula, however, it must be considered that for elaborating this product are employed ingredients such as sugar, cacao butter, emulsifiers and vanilla for the aroma, the latter is a phenolic compound that might contribute to the development of color with reactives used for the quantification of polyphenols (Sun *et al.*, 1998; Sarkar and Howarth, 1976).

Likewise, it is important to

El chocolate blanco presentó el más bajo contenido de polifenoles, a pesar de que no incluyen sólidos de cacao en su formulación, sin embargo, debe considerarse que para la elaboración de este producto se emplean ingredientes como azúcares, manteca de cacao, emulsificantes y vainilla para el aroma, este último compuesto es un anillo fenólico que puede contribuir al desarrollo de color con reactivos utilizados para la cuantificación de polifenoles (Sun *et al.*, 1998; Sarkar y Howarth, 1976). Así mismo, es importante considerar que los resultados obtenidos puedan deberse a la presencia de polifenoles en la manteca de cacao, a pesar de que los chocolates fueron desgrasados antes de la determinación de polifenoles, la interacción de la manteca de cacao con el resto de los ingredientes durante la manufactura del chocolate ha sido reportado como una fuente de antioxidantes lo que también pudiera contribuir a los resultados obtenidos (Auger *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006).

El contenido de polifenoles en los diferentes chocolates (excepto chocolate blanco) fue superior a los valores reportados por Waterhouse *et al.* (1996) en extractos metanólicos de chocolate oscuro y chocolate con leche con valores de 840 mgGAE.100g⁻¹ y 500 mgGAE.100g⁻¹, respectivamente y al rango de 3250-2062 mgGAE.100g⁻¹ señalados por BelščIk *et al.* (2009) en chocolates con diferentes contenidos de cacao (88%, 72% y 60), esto puede atribuirse también al hecho de que el contenido de polifenoles en los chocolates depende de la variedad del grano de cacao empleado, origen geográfico, condiciones de cosecha, condiciones de

considerar que the results obtained might be due to the presence of polyphenols in cacao butter, in spite of the fact that chocolates were defatted before the determination of polyphenols, the interaction of cacao butter with the rest of the ingredients during the elaboration of chocolate has been reported as an antioxidant source, which can also contribute to the results reported (Auger *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006).

The polyphenols content in the different chocolates (excepting white chocolate) was superior to the values reported by Waterhouse *et al.* (1996) in methanol extracts of dark chocolate and milk chocolate, with values of 840 mgGAE.100g⁻¹ and 500 mgGAE.100g⁻¹, respectively, and the rank of 3250-2062 mgGAE.100g⁻¹ mentioned by BelščIk *et al.* (2009) in chocolates with different cacao contents (88%, 72% and 60), this might be attributed to the fact that the polyphenols content in chocolates depend on the variety of the cacao grain employed, the geographic origin, harvest conditions, post-harvest conditions, processing and storing (Wollgast and Anklam, 2000). The polyphenols content in all chocolates was superior to the values reported for some tropical fruits, such as mulberry: 118.9 mgGAE.100g⁻¹; grape: 117.1 mgGAE.100g⁻¹; acai berry 136.8 mgGAE.100g⁻¹; guava: 83.0 mgGAE.100g⁻¹; strawberry: 132.1 mgGAE.100g⁻¹; pineapple: 21.7 mgGAE.100g⁻¹; graviola: 84.3 mgGAE.100g⁻¹ and passion fruit: 20.0 mgGAE.100g⁻¹ (Kuskoski *et al.*, 2005).

The polyphenols content in dark

postcosecha procesamiento y almace-
naje (Wollgast y Anklam, 2000).

El contenido de polifenoles en todos los chocolates fue superior a los valores reportados para algunas frutas tropicales como mora: 118,9 mgGAE.100g⁻¹; uva: 117,1 mgGAE.100g⁻¹; acai 136,8 mgGAE.100g⁻¹; guayaba: 83,0 mgGAE.100g⁻¹; fresa: 132,1 mgGAE.100g⁻¹; piña: 21,7 mgGAE.100g⁻¹; guanábana: 84,3 mg GAE.100g⁻¹ y parchita: 20,0 mgGAE.100g⁻¹ (Kuskoski *et al.*, 2005). El contenido de polifenoles en los chocolates oscuros y con leche fueron entre 3 y 8 veces mayor (resultados no mostrados) al rango promedio de 2068-1389 mgGAE.L⁻¹ en vinos tintos reportados por diversos autores (Fernández-Pachon *et al.*, 2004; Paixao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Pimentel *et al.* (2010) en un estudio comparativo del contenido de polifenoles en diferentes tipos de chocolate y vinos de varios cepajes concluyeron que los primeros presentaron un contenido de polifenoles de entre 2 y tres veces mayores que el determinado para vinos tintos, por lo cual deben ser considerados como una importante fuente de antioxidantes en la dieta.

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de las muestras analizadas se muestran en el cuadro 2. Los resultados del análisis estadístico indicaron la existencia de diferencias significativas en la actividad antioxidante evaluada en los diferentes chocolates. El chocolate C_{70%} presentó la mayor actividad antioxidante y el chocolate CB la menor.

Belščik *et al.* (2009) reportaron valores de actividad antioxidante

and milk chocolates were 3 and 8 times higher (results not shown) than the average rank from 2068-1389 mgGAE.L⁻¹ in red wines, reported by different authors (Fernández-Pachon *et al.*, 2004; Paixao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Pimentel *et al.* (2010) in a comparative research of the polyphenol content in different types of chocolates and wines of different strains, concluded that the first presented a polyphenol content 2 and 3 times higher than the one determined for red wines, thus, must be considered as important antioxidant source in the diet.

The evaluation results of the antioxidant activity of the analyzed samples are shown on table 2. The results of the statistical analysis indicated the existence of significant differences in the antioxidant activity evaluated in the different chocolates. Chocolate C_{70%} presented the highest antioxidant activity, and chocolate CB the lowest.

Belščik *et al.* (2009) reported values of the antioxidant activity (mmTrolox.L⁻¹) for different types of chocolates: 20.40 (dark with 88% of cacao), 17.73 (dark with 88% of cacao), 18.01 (dark with 72% of cacao) and 3.85 (milk chocolate), these values are inferior to the ones determined in this research, which might be attributed to the differences related to the composition and variety of cacao grains employed for the elaboration of the product, which may vary from one type to another (Wollgast and Anklam, 2000).

Adamson *et al.* (1999) indicate that the differences in the composition and quantity of polyphenols mentioned

(mmTrolox.L⁻¹) para diferentes tipos de chocolates: 20,40 (oscuro con 88% de cacao); 17,73 (oscuro con 88% de cacao); 18,01 (oscuro con 72% de cacao) y 3,85 (chocolate de leche), estos valores son inferiores a los determinados en este estudio, lo cual puede atribuirse a las diferencias relacionadas con la composición y variedad de los granos de cacao empleados para la manufactura del producto, los cuales pueden variar entre un tipo y otro (Wollgast y Anklam, 2000). Adamson *et al.* (1999) indica que las diferencias en la composición y cantidad de polifenoles, señalados como los principales compuestos responsables de actividad antioxidante, puede explicarse por las diferencias en los métodos de manufactura que pueden causar alteraciones químicas en el contenido de polifenoles. Adicionalmente, se debe considerar que la actividad antioxidante de una mezcla no es resultado de la suma de las actividades antioxidantes de cada uno de los componentes, sin embargo, la interacción de los propios compuestos entre sí, puede generar efectos sinérgicos o inhibitorios (Rodríguez y García, 2003).

Los chocolates blancos presentaron actividad antioxidante inferior al resto de los chocolates analizados a pesar de que los mismos no contienen cacao en su formulación, sin embargo como se indicó previamente la manteca de cacao con el resto de los ingredientes durante la manufactura del chocolate también pudiera contribuir a resultados obtenidos. Serafini *et al.* (2003) señalan que la formación de enlaces secundarios entre los flavonoides del chocolate y las proteínas (péptidos) de la leche durante la

as the main responsible of the antioxidant activity might be explained by the differences in the fabrication methods that may cause chemical alterations in the polyphenols content. Additionally, it must be considered that the antioxidant activity of a mix is not the sum of the antioxidant activities of each of the components, however, the interactions of the compounds in between might generate synergic or inhibitors effects (Rodríguez and García, 2003).

White chocolates presented an inferior antioxidant activity than the rest of the chocolates analyzed, even though these do not have cacao in their formula, however, as mentioned before, cacao butter along to the rest of the ingredients during the fabrication of chocolate, might also contribute with the results obtained. Serafini *et al.* (2003) mention that the formation of secondary links among the chocolate flavonoids and the proteins (peptides) of milk during the elaboration of the chocolate, might be one of the reasons for explaining the presence of antioxidant activity in white chocolate, which explains the results observed.

The antioxidant activity in dark chocolates was superior to the values reported for some fruits and vegetables ($\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$): squash: 2.86, avocado: 2.22, red radish: 2.22, cherry: 2.69, fig: 2.47, kiwi: 2.28 and pear: 2.19 (Pellegrini *et al.*, 2009). Dark and milk chocolates presented a superior activity to the ones reported by Landrault *et al.* (2001) in French wines, who reported average values ($\mu\text{mol Trolox. g}^{-1}$) of 18.29; 3.36 and 3.32 for red, rosé and red, respectively.

elaboración del chocolate podría ser una de las razones por la cual se puede presentar actividad antioxidante en el chocolate blanco lo que explica los resultados observados.

La actividad antioxidante en los chocolates oscuros fue superior a los valores reportados para algunas frutas y vegetales ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$): zucchini: 2,86; aguacate: 2,22; rábano rojo: 2,22; cereza: 2,69; higos: 2,47; kiwi: 2,28 y pera: 2,19 (Pellegrini *et al.*, 2009). Los chocolates oscuros y con leche presentaron una actividad antioxidante muy superior a los valores reportados por Landrault *et al.* (2001) en vinos franceses quienes reportan valores promedios ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) de 18,29; 3,36 y 3,32 para vinos tintos, rosados y tintos respectivamente.

En general los chocolates analizados constituyen una importante fuente de antioxidantes y compuestos fenólicos por lo cual su consumo moderado es recomendado en función de sus propiedades antineoplásicas y control de efectos degenerativos de radicales libres en el organismo.

Conclusión

El contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los chocolates analizados fue mayor conforme el contenido de sólidos de cacao presentes en el mismo aumento, indicativo de la estrecha relación entre ambos parámetros. En general los resultados obtenidos fueron superiores a los determinados para frutas, vegetales y vinos en estudios previos lo que sugiere las importantes características funcionales de los chocolates estudiados.

Generally, the chocolates analyzed constitute an important source of antioxidants and phenolic compounds, thus their moderate consumption is recommended in function of their anti-cancer properties and control of degenerative effects of free radicals in the organism.

Conclusions

The polyphenols content and the antioxidant activity of the analyzed chocolates were higher; the content of solids cacao present on it increased, this indicates a close relationship between both parameters. Generally, the results obtained were superior to those determined for fruits, vegetables and wines in previous researches; this suggests the important functional characteristics of the studied chocolates.

End of english version

Literatura citada

- Abbe, M y A. Isamil. 2010. Antioxidant properties of cocoa power. *J. Food Biochem.* 34: 111-128.
- Adamson, G., S. Lazarus., A. Mitchell., L. Prior., G. Cao y P. Jacobs. 1999. HPLC method for quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 47:4184-4188.
- Auger, C., N. Al-Awwadi., A. Bornet., J. Rouanet., F. Gasc y G. Cros. 2004. Catechins and procyanidinis in Mediterranean diets. *Food Res Int.* 37:233-245.
- Belščak, A., D. Komes., D. Horzic., K. Kovacevic y D. Karlovic. 2009.

- Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res Int.* 42: 707-716.
- Cámara, C., P. Fernández., A. Martín-Esteban., C. Pérez -Condes y M. Vidal. 2001. Toma y tratamiento de muestras. 1ra edición. Editorial Sinteis. España. 334p.
- Cidell, J y H. Alberts. 2006. Constructing quality: the multinational histories of chocolate. *Geoforum.* 37: 999-1007.
- Dreosti, I. 2000. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine. *Nutrition* 16: 7-8.
- Fernández-Pachón, M., D. Villaño, D., M. García-Parrilla y M. Troncoso. 2006. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chim Acta.*, 513: 113-118.
- Heiss, C., A. Deja., P. Kleinbongardd., T. Schewer., H. Sies y H. Klem. 2003. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA.* 290:1030-31.
- Ieggli, C., D. Bohrer., P. do Nascimento y D. de Carvalho, D. 2011. Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc and iron in emulsified chocolate samples by flame atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 124: 1189-1193.
- Jeanjean, N. 1995. Influence du genotype, de la fermentation et de la torrefaction sur le developpement de l'arôme cacao. These de doctorat. Université Montpellier II. Montpellier- France. 202 p.
- Keen, C., R. Holt., P. Oteiza., C. Fraga y H. Schmitz. 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr.* 81: 298S-303.
- Kris- Etherton, P y L. Keen. 2002. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Lipidol.* 13:41-49.
- Kuskoski, M., A. Asuero., A. Troncoso., J. Mancini y F. Roseane F. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Alimen.* 25(4): 726-732.
- Landrault, N., P. Poucheret., P. Ravel., F. Gasc., G. Cros y P. Teissedre. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agr Food Chem.* 49: 3341- 3348.
- Lee, K., Y. Kim., H. Lee y C. Lee. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7292-7295.
- Li, H., X. Wang., Y. Li., P. Li y H. Wang. 2009. Polyphenolic compounds and antioxidant activity in select China wines. *Food Chem.* 112: 454-460.
- Mella, A., R. Borguenson y L. Masson. 1987. Composición química y valor calórico de chocolates. Características físicas y químicas de la materia grasa. *Alimentos*, 12(4):7-14.
- Miller, K., D. Stuart., N. Smith., C. Lee., N. Mchale y J. Flanagan. 2006. Antioxidant activity and polyphenols and procyanidin contents of select commercially available cocoa-containing and chocolate products in United States. *J. Agric. Food Chem.* 54:4062-4068.
- Miller, N., Rice- Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V., y Milner, A. 1996. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84: 407-412.
- Murphy, K., A. Chronopoulos y I. Singh, I. 2003. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clinical Nutr.* 77:1466-73.
- Mursu, J., S. Voutilainen., T. Nurmi., T. Rissanen., J. Virtanen., K. Kaikkonen y Nyssönen, J. 2004. Free radical biology and medicine, 37(9):1351-1359.
- Norma venezolana COVENIN 1338. 1986. Alimentos envasados. Muestreo. Primera Revisión.

- Norma venezolana COVENIN 374. 1999. Humedad. Segunda Revisión
- Norma venezolana COVENIN 429. 1981. Café elaborado. Contenido de cenizas y sus características. Primera revisión.
- Norma venezolana COVENIN 479. 1997. Aceites y grasas vegetales. Determinación de Grasa. Primera Revisión.
- Norma venezolana COVENIN 52. 1999. Chocolate. Segunda Revisión
- Paixão, N., R. Perestrelo., J. Marques y J. Câmara. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.*, 105: 204-214.
- Pellegrini, N., P. Simonetti., G. Gardana., O. Brenna., F. Brighenti y P. Pietta, P. 2000. Polyphenol content and total antioxidant activity of ViniNovelli (Young red wines). *J. Agric. Food Chem.* 48:732-735.
- Pimentel, F., J. Nitzke., C. Klipel y E. Jong. 2010. Chocolate and red wine- A comparison between flavonoids content. *Food Chem.* 120: 109-112.
- Pons, C. 2010. Evaluación mediante tecnología NIRS de los insumos, transformación y chocolates elaborados con cacao (*Theobroma cacao*) de Tabasco. Trabajo especial de grado.
- Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas- Universidad de Tabasco- México.
- Prabhakaran, Nair. 2001. The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World. Elsevier Inc., 398pp.
- Rice- Evans, C., N. Miller y G. Papaganda. 1996. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med.* 26: 933-956.
- Rodríguez, R., y E. García. 2005. Actividad antioxidante y composición fenólica en vinos de Castilla- La Mancha. *Revista de Tecnología Higiene Alimentaria.* 362 (5):128:132.
- Sarkar, S y R. Howarth. 1976. Specific of the vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 24 (2):317-320.
- SAS. 2001. User's Guide. Statistics. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina.
- Serafini, M., R. Bugianesi., G. Maiani., S. Valtuena., S. De Santis y A. Crozier. 2003. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature.* 424: 1013.
- Shaidi., F; U. Wanasundra y A. Amarowich. 1994. Natural antioxidant from low pungency mustard flour. *Food Res Int.* 27, 489-493.
- Steinberg, F., M. Bearde y C. Keen. 2003. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, 215–223.
- Sun, B., R. Da Silva y I. Sprager. 1994. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46:4267-4274.
- Vit, P., M. Gutiérrez., D. Titra., M. Bednaø y A. Rodríguez -Malaver. 2008. Mieles checas categorizadas según su actividad antioxidante. *Acta Bioquim. Clínic Latin.* 42 (2): 237- 234.
- Wan, Y., J. Vinson., T. Etherton., J. Proch., S. Lazarus y K. Etherton. 2001. Effects of cocoa power and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am.J. Clin. Nutr.* 74:596-602.
- Waterhouse, A., J. Sirley y J. Donovan, J. 1996. Antioxidants in chocolate. *Lancet.* 34: 834.
- Wollgast, J., E. Anklam. 2000. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Res Int.* 33: 449-459.