



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DEL CACAO  
PARA LA ELABORACIÓN DE UNA INFUSIÓN  
ESTIMULANTE A BASE DE LA HOJA  
DEL ÁRBOL DEL CACAO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A  
MARÍA FERNANDA CARDOSO AGUILAR



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

Presidente: Prof. Angela Sotelo López  
Vocal: Prof. Francisco Javier Casillas Gómez  
Secretario: Prof. Leticia Gil Vieyra  
Primer suplente: Prof. Rosa María Argote Espinosa  
Segundo suplente: Prof. Patricia Severiano Pérez

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 111 Departamento de Farmacia, Conjunto E  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México

**Asesor del tema:**

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. Angela Sotelo López

**Supervisor Técnico:**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Patricia Severiano Pérez

**Sustentante:**

  
\_\_\_\_\_  
Maria Fernanda Cardoso Aguilar

**A mi esposo**

Roberto, a quien deseo expresarle mi más profundo amor y agradecimiento por su invaluable apoyo y ayuda.

Gracias por tu ejemplo de entusiasmo, dedicación y tenacidad.

Gracias por tu comprensión, paciencia y fortaleza en los momentos más frágiles y oscuros.

Gracias por todos los momentos compartidos.

Mi amor, tú me enseñaste a soñar y lo que hoy aprendí, es que toda realidad comienza con un sueño.

#### **A mi mamá**

Rosa María, quien ha sido siempre un pilar en mi vida, mi más profundo amor y admiración.

Ma, gracias por creer en mí y estar a mi lado en cada momento.

Gracias por enseñarme a vivir.

#### **A mi papá**

Eduardo, hoy pude llegar al final de un camino iniciado a tu lado.

Siempre serás parte importante en mi vida

Gracias por todo tu amor.

#### **A mi hermana Paulina**

Güera, gracias por todos los momentos que has recorrido a mi lado.

Gracias por tus consejos, tu ejemplo de fortaleza y por todos los secretos compartidos.

#### **A mi hermana María José**

MaJo, gracias por compartir tu vida conmigo.

Gracias por tu ejemplo de tenacidad y por enseñarme a vivir con alegría.

Siendo tú mi hermana más pequeña, con tu ejemplo me has enseñado a ser la hermana mayor.

Gracias por todo lo que significas para mí. Te quiero mucho.

#### **A mis abuelitos Fernando y Ma. Antonia (titos cerca)**

Tito Fer, no puedo olvidar los momentos vividos a tu lado

Gracias por continuar siempre junto a mí y formar parte de mi vida.

Siempre te admiraré.

Tita Tonita, gracias por cada instante de tu vida que no ha sido más que de amor y de entrega hacia mí.

Gracias por tus palabras de aliento y por caminar siempre a mi lado.

#### **A mis abuelitos Manuel y Esperanza (titos lejos)**

Tito Manuel, gracias por haberme hecho parte importante de tu vida.

Gracias por tu alegría y por hacer de mi infancia una etapa llena de fantasías e ilusiones.

Gracias por haberme hecho feliz y seguir a mi lado.

Tita Pelancho, gracias por tu cariño y tus oraciones, que cada día me acompañan, protegen e iluminan.

**A mi tía Chayito**

Tía, su vida será siempre un ejemplo para mí.

Gracias por su cariño.

**A mi tía Ma. Antonia**

Tía, gracias por todo tu apoyo y cariño.

**A mis primas Lucía, Rocío y Raquel**

A las tres les agradezco su cariño, confianza y todas sus enseñanzas.

Siempre están en mi pensamiento.

**A Ricardo Santillán**

Cuñis, gracias por ser un gran amigo y compartir grandes momentos a mi lado.

**A Daniel Calderoni**

Gracias por compartirme siempre tu alegría.

**A Johnny**

Por ser un amigo en el que puedo confiar

**A la M. en C. Angela Sotelo López**

Persona a la que tengo un especial reconocimiento por su preocupación por forjar un sinnúmero de profesionistas, y a quien le agradezco la dirección de esta tesis, su apoyo, su disposición, su paciencia, su tiempo y su afecto.

**A Lety, Iliana y Argelia**

Lety, gracias por tu amistad, cariño, ayuda y entrega para la culminación de este trabajo.

Gracias por creer en mí.

Iliis, gracias por tu amistad, cariño, apoyo, ayuda, confianza en mí, en este trabajo y por tus acertadas contribuciones

Arge, sin tu amistad, cariño, ayuda e impulso, me hubiera sido imposible terminar esta tesis.

Gracias a las tres por formar parte importante de mi vida, las quiero y admiro.

**Al profesor Francisco Javier Casillas Gómez**

A quien le agradezco todas sus atenciones y tiempo para la evaluación de este trabajo.

**A la Dra. Patricia Severiano Pérez**

Por su apoyo, tiempo y compromiso.

**A la Maestra Rosita Argote**

Por el gran apoyo, ayuda y amistad que siempre me brindó.

**Al Profesor Bernardo Lucas**

Por su afecto y ejemplo de trabajo.

**Al Dr. Gustavo García De la Mora y a la Maestra Ivonne Grillasca**

Quienes me han brindado su amistad, apoyo y afecto en todo momento.

Gracias por todas sus enseñanzas.

**A la Maestra Alex y a la Maestra Irene**

Por su amistad, cariño y respaldo

**A la Sra. Thompson**

De quien aprendí el fascinante mundo de la Química y la investigación.

Muchas gracias.

**A April**

Por su invaluable amistad y cariño.

Gracias por todas las experiencias compartidas.

**A Noemí y Paco**

Por su amistad, apoyo, cariño y tantos momentos compartidos.

**A Silvia, Zaida, Edna, Vero y Karina**

Por su amistad y cariño.

Gracias por formar siempre un gran equipo y estar siempre a mi lado.

**A Ricardo Villegas**

Gracias por ser un gran amigo, y compartir conmigo todos los días de estudio y esfuerzo.

Gracias por tantas pláticas compartidas.

**A Semei**

Por ser un gran compañero y amigo.

Gracias por todo tu apoyo.

**A Erika Guajardo**

Gracias por tu amistad y cariño.

**A Rodrigo y Dei**

Por su confianza, amistad y cariño.

Gracias por hacerme parte de su familia.

**A Gabriel Trejo**

Gracias por tu ayuda y amistad.

**A la Sra. Vicky**

Por siempre alentarme, por su paciencia y disposición.

**A Vicky**

Por tantas pláticas compartidas.

**A Sara Cantón**

Por su invaluable ayuda.

A todos mis compañeros del laboratorio 111, en especial a Sandra Vidal, Sandra Verónica, Héctor, Tibisai, Anita, Poncho, Carlos, Gaby.

A todos mis compañeros de generación, en especial a Oswaldo y Alejandro.

A todos mis compañeros de la Facultad de Química, en especial a Tere Sosa, Gaby Albarrán, Dany, Isabel Miralles, Helga, Arturo, Cuauhtémoc, Nancy, Ismael, Alejandro y Julio.

A todos mis maestros, en especial a Luci, maestra Lulú Osnaya, maestra Herminia, Ruth Martín, maestra Julieta Sandoval y al profesor Roberto Salcedo.

A todos los que colaboraron en las pruebas de Evaluación Sensorial

## Índice general

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Antecedentes	3
3.1. Historia del cacao	3
3.2. Botánica	4
3.2.1. Variedades silvestres	5
3.3. Extensión del cultivo de cacao	5
3.3.1. Producción de cacao	6
3.3.1.1. Producción de cacao en México	6
3.4. Beneficiado del cacao	7
3.5. Composición química del cacao	7
3.6. Alcaloides	9
3.6.1. Origen de los alcaloides en las plantas	10
3.6.2. Clasificación de los alcaloides	10
3.6.3. Propiedades físicas de teobromina, teofilina y cafeína	12
3.6.4. Propiedades farmacológicas de la teobromina, teofilina y cafeína	14
3.7. Métodos empleados para la medición de la concentración de teobromina, teofilina y cafeína	15
3.7.1. Cromatografía de líquidos	15
3.7.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	16
3.7.1.2. Ventajas de la cromatografía de líquidos de alta resolución	16
4. Metodología	18
4.1. Diagrama general de la investigación	18
4.2. Recolección de las muestras	19
4.3. Acondicionamiento de las muestras	19
4.4. Análisis Proximal	19
4.4.1. Humedad analítica	20
4.4.2. Cenizas	21
4.4.3. Grasa	22
4.4.4. Fibra cruda	23
4.4.5. Proteína cruda	24

4.4.6. Hidratos de carbono asimilables por diferencia	27
4.5. Determinación de taninos	27
4.6. Determinación semi-cuantitativa de alcaloides	30
4.7. Determinación cuantitativa de alcaloides por HPLC	32
4.8. Encuesta de consumo	34
4.9. Elaboración del producto	35
4.9.1. Empaque	36
4.10. Evaluación sensorial	36
4.10.1. Prueba de preferencia	37
4.10.2. Prueba de nivel de agrado	37
5. Resultados y discusión	39
6. Conclusiones	53
7. Bibliografía	54
8. Anexos	57
8.1. Curvas patrón de alcaloides	57
8.2. Cromatogramas	59
8.3. Encuesta de consumo	63
8.4. Evaluación sensorial	64

# 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas de las especies del género *Theobroma* pertenecen a la familia de las *esterculias* (*Sterculaceas*), formada por 22 especies de las cuales el cacao (*Theobroma cacao*, L.) es la única que presenta importancia comercial.

La semilla del cacao tiene una importancia comercial muy grande, motivo por el cual ha sido y sigue siendo objeto de numerosos estudios que han servido para el desarrollo de la tecnología aplicada a su utilización y procesamiento (1).

México ocupa un lugar importante a nivel mundial como productor de cacao, siendo los principales estados productores, Tabasco, Chiapas, parte de Oaxaca, Guerrero y Veracruz. Además, en nuestro país, la industria del cacao representa una gran importancia económica y en algunos estados, como es el caso de Tabasco, llega a ser la base del sustento de algunas familias.

Esto ha dado lugar al estudio de otras variedades silvestres pertenecientes a esta familia (*Sterculaceas*), así como también al estudio de diferentes partes del fruto del cacao y de otros órganos del árbol como son la cáscara y las hojas respectivamente, ya que éstas últimas han sido descartadas tanto para el consumo humano como para su uso comercial.

El té constituye la segunda bebida más consumida en el mundo, sólo detrás del agua.

Los efectos estimulantes de las metilxantinas (cafeína, teobromina y teofilina), se observan a varios niveles del organismo: del sistema nervioso, de la respiración, del músculo esquelético y cardiaco. Tienen también efecto diurético (aumentan la excreción de orina), participan en la dilatación bronquial (propiedad muy útil en enfermos asmáticos) y en el aumento del metabolismo basal.

Por todo esto, el presente trabajo tiene como propósito el desarrollo de una infusión similar al té, destinado al consumo humano, aprovechando otras partes del árbol del cacao como son las hojas, y la característica estimulante de éstas, debido al contenido de cafeína, teobromina y teofilina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Desarrollar una infusión tipo té a partir de la cáscara, cascarilla del fruto del cacao y/o de la hoja del árbol del cacao.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar el análisis proximal de la cáscara del fruto del cacao.
- Determinar el contenido de taninos en la cáscara del fruto y en la hoja del árbol del cacao.
- Conocer el contenido de alcaloides (cafeína, teobromina y teofilina) en la materia prima y en el producto terminado para la elaboración de una infusión con propiedades estimulantes, así como en dos tes comerciales.
- Seleccionar la materia prima adecuada en base al contenido de alcaloides para la elaboración de un sustituto del té con propiedades estimulantes.
- Realizar las pruebas sensoriales correspondientes al producto terminado y conocer su nivel de agrado comparado con otros productos comerciales.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Historia del cacao

En la época de la Conquista de México, a principios del siglo XVI, los granos de cacao no sólo se utilizaban para preparar una bebida, sino también como moneda, a veces para pagar el tributo a los señores aztecas, y también en diversos usos rituales y medicinales.

El grano de cacao era elemento esencial en la vida azteca, aunque no figuraba como alimento fundamental, sino secundario, a lado del maíz.

El uso del cacao como bebida se hallaba restringido a las clases superiores de la sociedad de aquellos tiempos, en cambio el empleo de las semillas como moneda era general, de tal manera que puede decirse que constituía la base del sistema comercial

Para utilizar el cacao como alimento existían diversos procedimientos. El cacao era secado al aire y conservado en estas condiciones, se preparaba tostándolo en vasijas de barro, con lo que se iniciaba el aroma y podían separarse fácilmente a mano la cutícula y la pulpa, bien en frío para prepararlo en polvo, o bien en caliente para formar una masa redonda. El cacao no era consumido solo, sino mezclado principalmente con maíz molido, y se hervía añadiéndole otros ingredientes como vainilla o alguna otra especia, haciendo con la mezcla una bebida espesa llamada chocolate (2).

Los españoles descubrieron que con los granos de cacao se podía hacer otra bebida más sabrosa para ellos, cuando eran mezclados con azúcar. En esta forma se hizo popular en España, de donde se extendió a otros países de Europa. Como resultado de ello, los españoles introdujeron el cacao a algunas otras de sus posesiones. De esa manera, el cultivo del cacao se extendió a Trinidad y a otras islas y países del Caribe, que abastecieron la creciente demanda de Europa. En el siglo XVII el gusto por la bebida de cacao pasó de España a Francia e Inglaterra, pero resultaba costosa, por lo que sólo era consumida en las casas aristocráticas inglesas(3).

### 3.2 Botánica

El cacao es un árbol de la familia *sterculiaceas*, del género *Theobroma*. Este género consiste de aproximadamente una veintena de especies; el cacao pertenece a la especie *Theobroma cacao L.* y es originario de los países cálidos de América. Es una típica planta tropical americana que se extiende espontáneamente por la cuenca amazónica, la zona del Caribe y la del Pacífico centroamericano (4).

En condiciones naturales, esto es, sometido a una densa sombra, medio ambiente tibio y húmedo, la temperatura de 18°C – 40°C y humedad relativa que llega al 100%, una precipitación anual mínima de 125 centímetros, el árbol del cacao alcanza alturas de cuatro a ocho metros (4,5).

El crecimiento y desarrollo del árbol del cacao comprende varias fases o etapas sucesivas, a saber:

- 1.- Cría en semillero y vivero.
- 2.- Formación del árbol mediante transplante
- 3.- Período juvenil
- 4.- Período de plena producción (35 a 40 años de edad)(6 )

El tronco es bastante tortuoso e irregular, las ramas, las hojas, las flores y frutos se hallan representados en alguna época del año y participan cada uno de ellos en diversa proporción en la constitución del cacao como se observa en el cuadro siguiente: (2,7).

Cuadro No. 1  
CONSTITUCIÓN DEL CACAO

ÓRGANO	% EN PESO
Raíces	27
Tronco	20
Ramas	43
Hojas	7
Flores y Frutos	3

Las flores son pequeñas, de aproximadamente un centímetro de diámetro de color rosa a blanco, no nacen aisladas sino en inflorescencias que tienen su iniciación en la axila de la hoja caída (4,5).

El fruto es una cápsula que según la especie y la variedad adopta diversos tamaños y colores con ligeras alteraciones de forma(8 ).

Las semillas son diversas en tamaño y forma, de acuerdo con la variedad, son también diferentes dentro del fruto, ya que las de los dos extremos son más pequeñas, aplastadas y deformes, suelen tener dos centímetros de largo, 0.7 centímetros de espesor y un centímetro de ancho ( 8 ).

### 3.2.1 Variedades Silvestres

Las especies silvestres son numerosas, si de momento estas especies no tienen interés práctico por el escaso valor comercial de sus productos, pueden en un futuro próximo ser un material muy útil.

Estos parientes del cacao no son introducidos en cultivo, pero algunos son aprovechados por los indígenas de los países en que nacen en forma silvestre: algunos ejemplos de estas variedades son: *Theobroma bicolor* y *Theobroma angustifolia* D.C. (1).

### 3.3 Extensión del cultivo de cacao

Se cree que el cacao se originó en las cabeceras de la cuenca del Amazonas y se puede suponer que en tiempos antiguos una población natural de *Theobroma cacao* se diseminó por toda la parte central de la zona Amazónica Guayana, hacia el oeste y al norte, llegando hasta el sur de México. En esas dos poblaciones se desarrollaron en dos formas, separadas geográficamente por el Istmo de Panamá, esta es una teoría reciente del origen de los dos tipos principales de cacao, Criollo y Forastero, encontrándose el primero al norte y occidente de los Andes y el segundo en la cuenca del Amazonas.

Su cultivo se ha ido extendiendo por otros países tropicales, siempre manteniéndose dentro de un medio apropiado en que resulte económico su cultivo, evitando zonas frías por excesivamente altas o fuera de latitud, o de lluvias escasas, mal repartidas para sus exigencias ( 2 ).

### 3.3.1 Producción de cacao

Actualmente los principales países productores de cacao son:

Cuadro No. 2

#### PRODUCCIÓN MUNDIAL DE CACAO En miles de toneladas

PAISES	1998/99	1999/00	2000/01	2001/02 *	2002/03 **	2002/03
COSTA DE MARFIL	1,163.0	1,403.6	1,212.4	1,265.0	1,300.0	43%
GHANA	397.4	436.9	395.0	340.6	475.0	16%
INDONESIA	390.0	422.0	392.0	455.0	440.0	14%
BRASIL	138.0	123.5	162.8	123.6	150.0	5%
MALASIA	75.0	45.0	35.0	25.0	40.0	1%
NIGERIA	198.0	165.0	177.0	180.0	165.0	5%
CAMERÚN	124.0	115.0	133.0	126.0	135.0	4%
ECUADOR	75.0	95.0	88.6	80.7	85.0	3%
REPÚBLICA DOMINICANA	25.9	37.1	44.9	44.5	45.0	1%
COLOMBIA	37.6	37.5	37.1	38.0	38.0	1%
MÉXICO	35.0	36.4	34.0	35.0	35.0	1%
NUEVA GUINEA	35.6	46.8	38.8	41.0	42.0	1%
R. DEL MUNDO	113.8	113.8	102.8	100.9	105.7	3%
<b>TOTAL</b>	<b>2,808.3</b>	<b>3,077.6</b>	<b>2,853.4</b>	<b>2,855.3</b>	<b>3,055.7</b>	<b>100%</b>

\* Estimado

\*\* Pronóstico

Fuente.-Organización Internacional del Cacao,2003

#### 3.3.1.1 Producción de cacao en México

En el caso de México durante el ciclo agrícola 2000/01 se obtuvo una producción anual de 28,046 toneladas, cifra que representó una importante caída de 32% con respecto al ciclo anterior. Del total, Tabasco participó con el 77% y Chiapas con el 21%. El resto se distribuyó en Oaxaca y Guerrero.

Las cifras indican que en 2001, la cosecha ascendió a 46,737 toneladas. Tabasco obtuvo un volumen de 33,791 toneladas y Chiapas de 12,686 toneladas. ( 9 )

Las especies conocidas en México son: el cacao, que se cultiva en los estados de Colima, Chiapas y Tabasco, la "castarrica" (*Theobroma angustifolium*, D.C.) y el "pataste" (*Theobroma bicolor*, H.B.), que crecen en forma silvestre en los estados de Chiapas y Tabasco (1).

### 3.4 Beneficiado del cacao

Con el nombre de beneficiado se designa toda la serie de operaciones a que se somete un producto natural para convertirlo en un artículo comercial exportable; en el caso del cacao, dichas operaciones consisten, sucesivamente, en la fermentación, secado, limpieza, selección y clasificación, junto con labores complementarias, como el pulimiento, abrillantamiento y el antiguo terrado, hoy prácticamente desaparecido.

El fin fundamental del beneficiado es convertir el cacao en un producto conservable, de fácil transporte y que posea las cualidades de aroma y sabor que le dan todo su valor comercial para su posterior utilización en las industrias de la alimentación, de las grasas y farmacéuticas.

Actualmente se han efectuado un gran número de investigaciones en diversos países, los cuales proporcionan un conocimiento sobre la microflora y cambios que se efectúan en el interior de las almendras durante el beneficio (10).

### 3.5 Composición química del cacao

La composición química del cacao tiene, además de un interés teórico, aplicaciones inmediatas, puesto que con su conocimiento se obtiene una primera aproximación de los productos extraídos del suelo con las cosechas; de las necesidades de fertilizantes de una tierra, de las carencias o límites tóxicos de algunos elementos, cuyo mejor detector es el análisis de la hoja, de la posible utilización de diversos subproductos para combustibles, piensos, abonos, materia prima para la industria de la fermentación, etc.

Se han hecho análisis de las diferentes partes del cacao, como son hojas, cascarilla, grano, etc. A continuación se esquematizan algunos datos obtenidos y reportados en la bibliografía (3).

Cuadro No. 3  
COMPOSICIÓN DE LAS HOJAS DEL CACAO<sub>(3)</sub>

	Máx %	Min %
Cenizas en materia seca	8.59	5.69
N <sub>2</sub> (referido a cenizas)	39.90	26.80
Anhídrido fosfórico	11.40	6.90
Potasa	41.40	25.60
N/P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	4.10	3.10
N/K <sub>2</sub> O	1.36	0.73
K <sub>2</sub> O/P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5.20	2.60

▼En las cenizas

Cuadro No. 4  
COMPOSICIÓN DE LA CÁSCARA FRESCA DEL CACAO<sub>(3)</sub>

	Calabacillo %	Forastero %
Agua	82.9	84.5
Celulosa digestible	5.4	4.0
Fibras leñosas	3.3	5.3
Albuminoides	0.8	1.0
Materia nitrogenada indeterminada	0.2	---
Grasa	0.1	0.1
Glucosa	0.1	---
Sacarosa	Indicios	1.0
Almidón	0.5	0.4
Materias astringentes	2.2	0.2
Pectina	1.7	1.0
Rojo de cacao	0.7	0.6
Teobromina	0.1	0.1
Cafeína	---	---
Ácido tartárico libre	0.3	0.3
Ácido tartárico combinado	0.8	0.6
Ácido acético libre	0.1	0.1
Peróxido de hidrógeno	0.01	0.01
Magnesia	0.1	0.1
Cal	0.04	0.04
Potasa	0.01	0.01
Sosa	0.04	0.03
Sílice	0.01	0.01
Anhídrido sulfúrico	0.04	0.03
Anhídrido fosfórico	0.08	0.1
Cloro	0.03	0.03

### 3.6 Alcaloides

Después del descubrimiento y aislamiento de algunas bases nitrogenadas naturales, como la morfina, la quinina, la cocaína y la estricnina, se encontró que su carácter es semejante a los álcalis en cuanto a formar sales con los ácidos, motivó por el cual se dio a este grupo el nombre de alcaloides; esto es, sustancias parecidas a los álcalis. Hoy se acepta que el término alcaloide denota generalmente una base nitrogenada de origen vegetal (11).

En la mayor parte de los miembros de esta clase de compuestos, el átomo de nitrógeno se halla en una estructura cíclica, aún cuando hay excepciones es esta regla, como son la efedrina, hordenina y mezcalina (11).

Los alcaloides no están muy diseminados en el reino vegetal y son producidos generalmente por angiospermas, sobre todo por dicotiledóneas y rara vez por monocotiledóneas. Los alcaloides se hallan en solución en el jugo celular, especialmente en el tejido parenquimatoso joven. En tejido más viejo (corteza), algunas veces se acumulan en estado sólido y forman sales, por ejemplo, la quinina. Se encuentran con frecuencia en las semillas (anonáceas) y en las hojas (solanáceas y rubiáceas); las raíces son los principales productores de alcaloides de los géneros *Aconitum*, *Corydalis* e *Hydrastis*. Por regla general, los alcaloides no se presentan en estado natural en la planta, sino formando sales con algún ácido, principalmente con los ácidos cítrico, málico, tánico, succínico, oxálico, sulfúrico clorhídrico y fosfórico. En ciertos casos se forma un ácido específico en relación con los alcaloides derivados de determinadas plantas.

Los alcaloides constan generalmente de los cuatro elementos: carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, pero se conocen algunos que no contienen oxígeno, como la conina, la nicotina y la conesina. En general son sustancias incoloras que forman cristales. Hay alcaloides líquidos, que pertenecen principalmente a los grupos de la higrina, la conina y la nicotina. La mayor parte de los alcaloides tienen actividad óptica, hacen girar el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (levógiros), pero unos cuantos son dextrógiros, como la conina, la cinchonina, la laudanosina y la pilocarpina; y otros son óptimamente inactivos, como la berberina y la papaverina. Con frecuencia producen marcado efecto fisiológico en el organismo animal. Los más de ellos forman sales cristalinas que son útiles para separar o purificar la base respectiva (11).

### 3.6.1 Origen de los alcaloides en las plantas

Los productos primarios de asimilación en las plantas son los mismos para las síntesis de las proteínas que para la de los alcaloides. Cuando la asimilación es intensa, se producen alcaloides, pero en períodos de menor asimilación, las enzimas que promueven la síntesis de proteínas desintegran a los alcaloides, y los productos de descomposición sirven para formar proteínas. Esta relación entre el metabolismo de las proteínas y la degradación de los alcaloides en las plantas es excepcional, ya que es bastante pequeña la proporción de especies vegetales productoras de alcaloides.

Otra teoría acerca de la biogénesis de los alcaloides es la de Pictet, quien supone que los alcaloides son productos de catabolismo que resultan de dos funciones sucesivas: a) la descomposición de sustancias nitrogenadas complejas, como las proteínas y la clorofila, con producción de fragmentos relativamente sencillos; b) la recombinación o condensación de estos fragmentos con otras sustancias que hay en la planta, por medio de reacciones secundarias, como la mutilación de los grupos hidroxilo (-OH) e imino (=NH) con la intervención del formaldehído. Existe otra teoría, la teoría de la síntesis fotoquímica, con la cual se trata de explicar la formación de casi todas las clases importantes de alcaloides mediante reacciones en que participan sustancias y circunstancias que se sabe existen en la planta. Esta teoría está fundada en dos importantes reacciones, por medio de las cuales se efectúa la unión entre carbono y carbono, y que son: a) la condensación aldólica y b) la condensación de un aldehído o cetona con amoníaco o una amina para la formación de una alcalina y la reacción de ésta con sustancias que tienen el grupo =CH-CO- para formar =N-C-C-CO- . (11)

### 3.6.2 Clasificación de los alcaloides

Los alcaloides se clasifican, según su fuente de origen y estructura, en más de 30 grupos. A continuación se citan algunos de ellos (11):

1. Alcaloides de la efedra.- Se han encontrado seis en las hojas de la efedra. Los más importantes son: la l-efedrina, la pseudoefedrina, la l-norefedrina, la d-norseudoefedrina, la N-metiefedrina y la N-metilseudoefedrina.
2. Alcaloides de la pirrolidina.- En este grupo se encuentran la higrina, la cuscohigrina, halladas en la hoja de coca del Perú, la carpaina, que se presenta en el fruto, las semillas y especialmente en las hojas de papaya y la betonicina.

3. Alcaloides de la piridina y la piperidina.- En este grupo se clasifican la piperidina, la piperina, que se encuentran presentes en algunas pimientos. También pertenecen a este grupo la ricina y la trigonelina, presente en las semillas de la alhova.
4. Alcaloides de la areca.- Los alcaloides pertenecientes a este grupo son derivados del ácido tetrahidronicotínico. El principal es la arecolina. A este mismo grupo pertenecen la guvacina, la isoguvacina, la guvacolina y la arecaidina.
5. Alcaloides del tabaco.- El mejor conocido de estos alcaloides es la nicotina. También existen la normicotina, la l-anabasina, la N-metil-anabasina, la nicotirina y la isonicotina. En cada especie de tabaco predomina un alcaloide distinto.
6. Alcaloides de la coca.- Las hojas de coca contienen alcaloides que se clasifican de la siguiente manera: a) cocaínas o metilalcaloides, b) seudotropanos, c) acilegoninas, d) dihidroxitropanos y e) higrinas. El principal es la cocaína
7. Alcaloides del opio.- El opio, que es el jugo desecado de las cápsulas verdes de la adormidera contiene muchos alcaloides. El alcaloide más importante del opio es la morfina. Otros alcaloides presentes son la papaverina, la laudanosina, la laudanina, la laudanidina, la codamina, la narcotina, la codeína, la tebaina y la neopina.
8. Purinas.- A continuación se habla con más detalle del grupo de las purinas, por ser este el grupo de alcaloides al cual pertenece la teobromina y la cafeína, ambas de máximo interés para el presente trabajo.

Los alcaloides que se encuentran en el café, cacao y el té, se conocen con el nombre genérico de bases purínicas porque todos ellos son derivados de la misma sustancia original, la purina.

Muchos de estos alcaloides son también derivados de la xantina, que es la 2,6(1,3)-purinodiona o 2,6-dihidroxipurina.

Aunque la purina no existe en estado libre en la naturaleza, se obtiene por síntesis y es un sistema de anillos fundamental de varios productos elaborados por los organismos vegetales y animales, principalmente del ácido úrico, que es la 2,6,8(1,3,9)-purinotrión o 2,6,8-trihidroxipurina. En este grupo se encuentran la teofilina, la xantina, la guanina, la adenina, la cafeína y la teobromina. Esta última es uno de los componentes más característicos del cacao, siendo el principal alcaloide del *Theobroma cacao*.

La teofilina es isómero de la teobromina pero por semejantes que sean en cuanto a composición química, presentan diferentes propiedades. (11).

La teobromina, teofilina y cafeína son tres alcaloides estrechamente relacionados entre sí, que provienen de plantas de amplia distribución geográfica, como el café, té, cacao, etc.

Las xantinas de importancia farmacológica resultan de la introducción de grupos metilo a nivel de los átomos de nitrógeno heterocíclico, originándose la teobromina y la teofilina que son dimetilxantinas y la cafeína que es trimetilxantina. Estas xantinas pueden considerarse como alcaloides porque al solubilizarse en agua dan soluciones alcalinas.<sup>(11)</sup>

### 3.6.3 Propiedades físicas de teobromina, teofilina y cafeína

#### Teobromina

- Nombre químico: 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1,3H-purina-2,6-diona.
- Fórmula química condensada:  $C_7H_8N_4O_2$
- Peso molecular: 180.17 : C=46.66%, H=4.48%, N=31.1% y O=17.76%
- También se le da el nombre de: 3,7-dimetilxantina
- Es el principal alcaloide del cacao, el cual contiene de 1.5 a 3% de este alcaloide.
- Cristaliza de sus soluciones acuosas en agujas monoclinicas
- Su punto de fusión es de 357°C, sublima a 290-295°C.
- Un gramo de teobromina se disuelve en 2000 mL de agua, 150 mL de agua hirviendo, 2220 mL de alcohol al 95%.

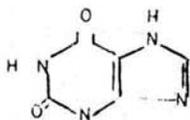
#### Teofilina

- Nombre químico: 3,7-dihidro-1,3-dimetil-1,3H-purina-2,6-diona.
- Fórmula química condensada:  $C_7H_8N_4O_2$
- Peso molecular: 180.17 : C=46.66%, H=4.48%, N=31.1%, y O=17.76%
- Se le da también los nombres de: 1,3-dimetilxantina; Teococina; Acourbrón; Amorfina.
- Es un polvo blanco cristalino de sabor amargo, es isómero de la teobromina, existe en pequeña cantidad en el té. Su punto de fusión es de 270 a 274°C, se sintetiza de dimetil urea y etilcianoacetato.
- Un gramo se disuelve en 120 mL de agua, 80 mL de alcohol, 110 mL de cloroformo.
- Soluble en agua hirviendo, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, ácido clorhídrico o ácido nítrico diluido.

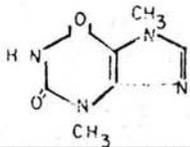
### Cafeína

- Nombre químico: 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1,H-purina-2,6-diona
- Fórmula química condensada:  $C_7H_8N_4O_2$
- Peso molecular: 194.19 : C=49.48%, N=28.25%, H=5.19% y O=16.48%
- Otros nombres de la cafeína que se conocen son: 1,3,7-trimetilxantina; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina; Teína; Guaranina; Metil teobromina.
- Sublima de 178 a 180°C a presión atmosférica formando prismas hexagonales en forma de agujas incoloras. Su punto de fusión es de 238°C, hierve a 348°C con vapor incoloro y descomposición parcial.
- Un gramo de cafeína se disuelve en 46 mL de agua, 5.5 mL de agua a 80°C, 1.5 mL de agua hirviendo, 66 mL de alcohol, 122 mL de alcohol al 60°, 50 mL de acetona.
- El ácido sulfúrico y el ácido nítrico la disuelven sin decolorar ( 12 ).

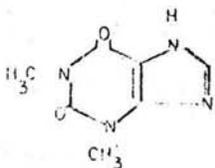
Las fórmulas de las xantinas son:



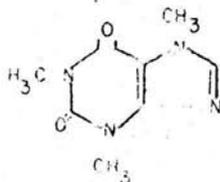
**XANTINA**  
3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona



**TEOBROMINA**  
3,7-dihidro-3,7-dimetil-1,H-purina-2,6-diona



**TEOFILINA**  
3,7-dihidro-1,3-dimetil-1,H-purina-2,6-diona



**CAFEÍNA**  
 3.7-dihidro-1.3.7-trimetil-1.H-purina-2.6-diona

### 3.6.4 Propiedades farmacológicas de teobromina, teofilina y cafeína

La teobromina, teofilina y cafeína tienen en común varias acciones farmacológicas de interés terapéutico, en este orden creciente en potencia, estimulan al sistema nervioso central (SNC). Avivan la actividad mental, el rendimiento físico y la asociación de ideas, quitan la fatiga y la somnolencia. Estos efectos pueden producirse con 85 a 250 mg de cafeína o la cantidad contenida en una o tres tazas de café.

Por la vía oral o parenteral provocan un aumento prolongado de la secreción gástrica, son irritantes para la mucosa gástrica y pueden provocar náuseas y vómitos, lo que limita su administración por vía oral.

En este sentido, la teofilina se libera fácilmente en el estómago cuando se administra, es la más irritante y es capaz de provocar erosiones hemorrágicas.

Las xantinas son diuréticos aumentando el volumen urinario, así como la excreción de iones de sodio (saluresis). También disminuyen la reabsorción tubular del sodio. Aumentan la capacidad funcional del músculo estriado haciendo más potente la contracción.

Las xantinas se absorben por todas las vías en que se administren (bucal, rectal, intramuscular), siendo los derivados solubles los que se absorben mejor. Hay que señalar que las xantinas liberadas a nivel del estómago se comportan como bases sumamente débiles, la cafeína y la teofilina se encuentran parcialmente ionizadas en el jugo gástrico e intestinal absorbiéndose también parcialmente ( 13, 14, 15 ).

### **3.7 Métodos empleados para la medición de la concentración de teobromina, teofilina y cafeína**

El método del AOAC (Official Methods Of Analysis) No. 15.019 de Bailey-Andrew se basa en la determinación del nitrógeno total de la muestra.

Otro método del AOAC es el cromatográfico espectrofotométrico No. 15.020, que consiste en la separación del compuesto por medio de columnas cromatográficas (una ácida con ácido sulfúrico y Celite 545 y una básica con hidróxido de potasio y Celite). Este método basado en la absorción de luz ultravioleta por los alcaloides es muy complicado, tiene muchas manipulaciones debido a la preparación de las columnas y a la separación y obtención de las muestras en las columnas.

Existen otras técnicas para el análisis de estos alcaloides en diversos productos alimenticios las cuales utilizan el método de Kjeldahl, espectrofotometría ultravioleta, cromatografía en capa fina, cromatografía de gas, cromatografía en papel, titulaciones potenciométricas, etc. Estos métodos requieren tratamientos lentos y a veces complicados o bien no permiten la separación y cuantificación de los tres alcaloides al mismo tiempo.

Para la realización de este trabajo se eligió la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) por su alta resolución, rapidez, sensibilidad, así como para detectar, separar y cuantificar los tres alcaloides que se analizan en el trabajo al mismo tiempo (16).

#### **3.7.1 Cromatografía de líquidos**

La cromatografía es un término aplicado a una amplia variedad de técnicas de separación de una sustancia, donde se emplea una fase móvil que puede ser un gas o un líquido y una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

Los componentes de una mezcla se transportan a través de la fase estacionaria por medio de la fase móvil que fluye (2, 17).

Las separaciones se basan en las diferentes velocidades de migración de los componentes de la muestra.

Los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil, capaces de interactuar con la fase estacionaria, ya sea disolviéndose, absorbiéndose o reaccionando químicamente con ella. Como consecuencia durante la separación los componentes se distribuyen en esta fase.

### **3.7.1.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

El término de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se define como la técnica de cromatografía de líquidos que emplea en su operación alta presión en la fase móvil, también se le puede llamar cromatografía de líquidos de alta velocidad o cromatografía de líquidos moderna( 2, 17).

La cromatografía de líquidos de alta resolución se basa en los mismos principios de la cromatografía de gases y tiene muchas ventajas sobre ésta, algunas de ellas son las siguientes: no está limitada por la estabilidad térmica y volatilidad de las muestras, es ideal para la separación de especies iónicas, productos hábiles, compuestos estables y/o de peso molecular alto, tiene una gran variedad de empaques que pueden ser utilizados como fase estacionaria en la columna, la separación de los componentes de una muestra se puede llevar a cabo a temperaturas bajas, sus fases cromatográficas entran en interacción con las moléculas de las muestras y las muestras se pueden recuperar.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, emplea columnas reusables, que pueden ser usadas en diferentes tipos de muestra, la inyección se lleva a cabo fácil y rápidamente empleando una jeringa de inyección o una válvula de muestra, el flujo de solventes se produce por bombas de alta presión, la detección y cuantificación se lleva a cabo en detectores continuos de varios tipos y los resultados son registrados automáticamente de la separación de los componentes de la muestra.

### **3.7.1.2 Ventajas de la cromatografía de líquidos de alta resolución**

La cromatografía de líquidos de alta resolución puede ser considerada complementaria a la cromatografía de gases. En muchos casos las dos técnicas se usan para efectuar la misma separación. En la cromatografía de gases es necesaria la formación de derivados, en cambio en la cromatografía de líquidos de alta resolución esto puede ser o no factible. Para los materiales que son termolábiles o no volátiles, la cromatografía de líquidos de

alta resolución es una selección adecuada. La formación de derivados se está haciendo más común en la cromatografía de líquidos, para incrementar la sensibilidad del detector visible-ultravioleta.

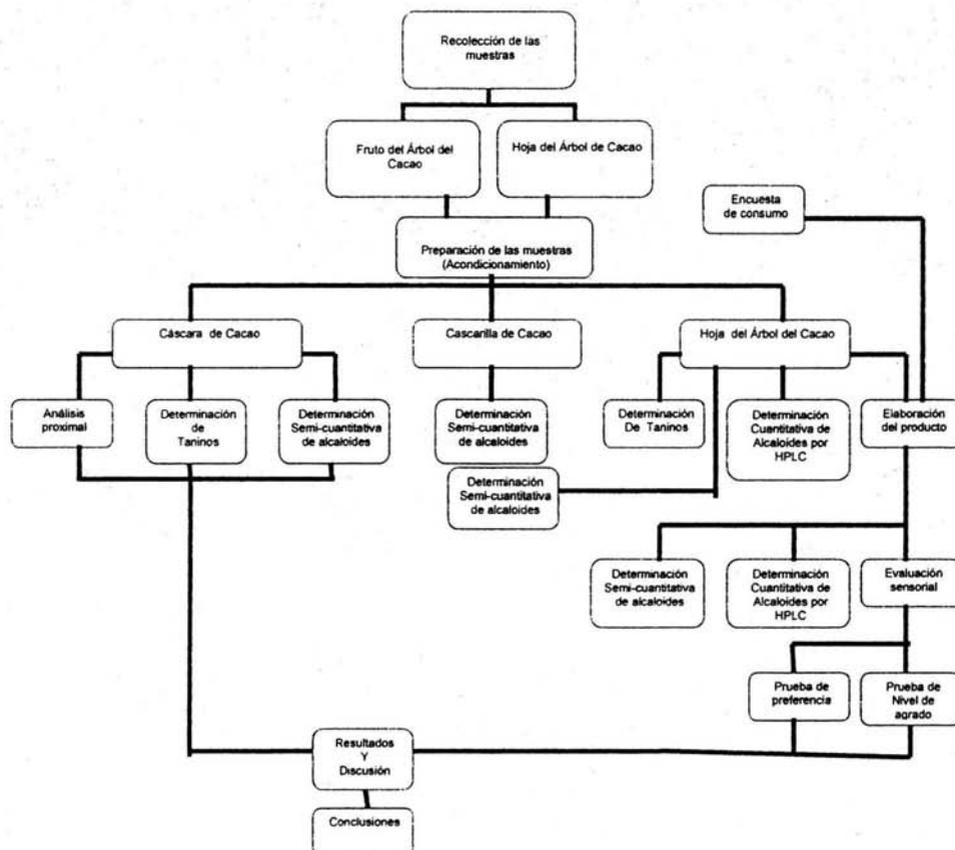
La cromatografía de líquidos de alta resolución ofrece muchas ventajas sobre la cromatografía de líquidos tradicional como:

- a) Rapidez
- b) Resolución
- c) Sensibilidad, detector único
- d) Columnas reusables
- e) Ideal para grandes moléculas y especies no iónicas
- f) Fácil recuperación de la muestra (2,17)

## 4. METODOLOGÍA

4.1 La metodología propuesta para el desarrollo de la investigación se muestra en la Figura No. 1

Figura No. 1 Diagrama general de la investigación



## **4.2 Recolección de las muestras**

Tanto el fruto como la hoja del árbol del cacao se recolectaron de un árbol perteneciente a la especie *Theobroma cacao* ubicado en un jardín particular en Cuernavaca, Morelos,.

## **4.3 Acondicionamiento de las muestras**

Al fruto se le separó la cáscara y la cascarilla, ambas se secaron por separado. Las muestras se secaron a 53°C durante 48 horas en una estufa Lab-Line Imperial III; posteriormente se molieron las muestras en un molino Thomas-Wiley Laboratory Mill Modelo 4, con una malla de 1 mm de diámetro. Las muestras molidas se guardaron en recipientes bien cerrados.

Las hojas del árbol del cacao se lavaron para eliminar el polvo y posteriormente se secaron a 53°C durante 36 horas en una estufa Lab-Line Imperial III; a continuación se molieron en un molino Thomas-Wiley Laboratory Mill Modelo 4. Una cuarta parte se pasó por una malla de 1 mm de diámetro, y el resto se separó para la elaboración del producto, para lo cual se pasó por una malla de 2 mm de diámetro.

## **4.4 Análisis proximal**

Al polvo obtenido del secado por estufa de la cáscara del fruto del árbol del cacao se le realizó un análisis proximal de acuerdo a los métodos del AOAC 1990<sub>(18)</sub>., siendo las determinaciones:

- Humedad analítica
- Cenizas
- Grasa cruda
- Fibra cruda
- Proteína cruda
- Carbohidratos asimilables por diferencia

#### 4.4.1 Determinación de humedad analítica

##### Fundamento

Se basa en la pérdida de agua de la muestra por efecto de la temperatura. Es indispensable conocer la humedad de la muestra, para darle un valor real a la cantidad de los otros componentes. Por otro lado, el dato de humedad está relacionado con la edad y/o el estado de conservación de la muestra.

##### Material / Reactivos

- Estufa de vacío Lab-Line Modelo 3620
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Desecador
- Charolas de aluminio para humedad

##### Procedimiento.

Pesar de 2-3 g de muestra preparada en una charola de aluminio para humedad, que ha sido previamente puesta a peso constante a  $55^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Secar la muestra en la estufa a  $55^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y a un vacío de 15 mmHg de presión, las horas que sea necesario hasta que dos pesadas sucesivas no registren diferencia de 0.0001 g. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente.

##### Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

A = Peso charolas de aluminio más muestra

B = Peso charolas de aluminio más muestra después de secar a la estufa

C = Peso de muestra en gramos

## 4.4.2 Cenizas

### Fundamento

Las cenizas incluyen todos los compuestos inorgánicos de la muestra, tanto los originales como los de contaminación. Al incinerarse una muestra se logra la destrucción de la materia orgánica, obteniéndose así las cenizas como residuos, los cuales se pueden cuantificar gravimétricamente.

### Material / Reactivos

- Mufla Termolyne Modelo 1500
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Mechero bunsen
- Crisoles de porcelana
- Desecador

### Procedimiento.

Pesar aproximadamente 3 a 5 g de muestra en un crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente puesto a peso constante después de meterlo a la mufla a 550°C . Calcinar la muestra, para ello carbonizar primero con mechero hasta que no se desprendan humos y meter a la mufla cuidando que la temperatura no pase de 550°C para evitar que los cloruros se volatilicen. Se suspende el calentamiento cuando las cenizas estén blancas o grises, aproximadamente 3 a 4 h (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de agua destilada , se secan en la estufa a 130°C y se vuelven a calcinar). Enfriar en desecador y pesar.

### Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol vacío})}{\text{peso de muestra en gramos}} \times 100$$

### 4.4.3 Grasa cruda

#### Fundamento

Esta determinación se basa en la solubilidad de las grasas en compuestos no polares como el éter etílico, de petróleo, etc. , el cual se calienta hasta que se volatilice y al hacer contacto con la superficie fría (refrigerante) se condensa y pasa a través de la muestra arrastrando consigo las sustancias solubles.

#### Material / Reactivos

- Aparato de extracción Goldfish Labconco Modelo 35001
- Cartuchos de celulosa
- Vasos de borde esmerilado
- Estufa de vacío Lab-Line Modelo 3620
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Desecador
- Éter de Petróleo (R.A.) J.T.Baker

#### Procedimiento.

Poner un vaso Goldfish a peso constante a 100°C enfriar y pesar.

Pesar en un cartucho de celulosa de 4 a 5 g de muestra, tapar con algodón y colocarlo en un sostenedor o recipiente con el fondo perforado. Por otro lado, en el vaso a peso constante se ponen aproximadamente 50 mL de éter de petróleo y se coloca en el aparato de Goldfish mediante un anillo de fierro con empaque de hule. Se sube la parrilla dando medio giro para un lado y después para el otro. Calentar 4 horas y comprobar que la extracción haya sido completa (hasta que el solvente esté libre de grasa). Al finalizar se cambia el sostenedor con el cartucho por otro recipiente cerrado sin perforación y se vuelve a calentar para recuperar el éter. Al evaporarse totalmente el éter del vaso, éste se quita del aparato y se mete 2 horas en la estufa hasta alcanzar peso constante, se enfría en el desecador y se pesa.

#### Cálculos.

$$\% \text{ Grasa Cruda} = \frac{(\text{peso vaso con grasa} - \text{peso vaso vacío})}{\text{peso de muestra en gramos}} \times 100$$

#### 4.4.4 Fibra Cruda

##### Fundamento

La fibra cruda es la fracción orgánica de la muestra que resiste un tratamiento alternado de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio hirvientes al 1.25%. El compuesto más abundante de este residuo es el hidrato de carbono celulosa y en menos cantidades hemicelulosa, ligninas y pentosanas

##### Material / Reactivos

- Vasos de Berzelius de 600 mL
- Aparato de digestión Labconco
- Estufa de vacío Lab-Line Modelo 3620
- Mufla Termolyne Modelo 1500
- Crisoles de porcelana
- Filtro de lino
- Desecador
- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Solución de  $H_2SO_4$  al 1.25%
- Solución de NaOH al 1.25%
- Antiespumante
- Alcohol etílico

##### Procedimiento.

Pesar 4 g de muestra desengrasada sobre un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de silicato de aluminio (limpio y calcinado) y unas perlas de vidrio. A continuación se le adiciona 200 mL de solución de ácido sulfúrico al 1.25% (0.255N) que este hirviendo y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se coloca en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente; se deja digerir por espacio de 30 minutos exactos. Después de dicho periodo se vacía el contenido sobre un califonia que contenga filtro de lino y se realiza la filtración con ayuda de vacío; se lava el residuo con agua destilada caliente, hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 mL). Una vez lavado el residuo se transfiere nuevamente al vaso Berzelius, se le adiciona unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH 1.25 % que esté hirviendo y se mantiene en el aparato de digestión por exactamente 30 minutos. Transcurrido el tiempo se vacía nuevamente al filtro de lino

y se filtra, lavando el residuo con agua caliente (aproximadamente 500 mL), hasta eliminar el álcali y también quitar las perlas de vidrio lavándolas con agua para recuperar el material adherido. Por último se le adiciona al residuo 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se pasa a un crisol de porcelana (a peso constante) cuidando de pasarlo en forma cuantitativa. Se coloca en la estufa de vacío para su secado (aproximadamente de 4 a 8 horas) y después se pesa. A continuación se carboniza y se introduce en la mufla para su incineración, para después de realizada dicha operación volver a pesar el crisol.

#### **Cálculos.**

$$\% \text{ Fibra} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

A = Peso del crisol más fibra después de secado (en gramos).

B = Peso del crisol con cenizas después de calcinar (en gramos).

C = Peso de la muestra original (en gramos).

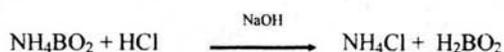
### **4.4.5 Proteína Cruda**

#### **Fundamento**

A pesar de que el método Kjeldahl se ha automatizado el fundamento sigue siendo el mismo: se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco, el cual queda en la solución en forma de sulfato de amonio debido a que en la mezcla de reacción siempre hay un exceso ácido. La reacción es la siguiente:



Se ha logrado reducir el tiempo de digestión mediante la adición de sulfato de sodio ó de potasio, los cuales elevan la temperatura de digestión. La adición de peróxido acelera la digestión y reduce la formación de espuma. El amoníaco obtenido después de la digestión es liberado por destilación por la acción de un álcali atrapado en ácido valorado para su posterior titulación ácido-base.



### Equipo.

- Digestor TECATOR, modelo ab-20/40.
- Equipo automático para determinación de proteína Auto Analyzer Kjeltex, modelo 1030 (destilador).
- Tubos de digestión TECATOR de 75 mL.
- Balanza analítica Sartorius Analytic

### Reactivos.

- Peróxido de hidrógeno al 30%.
- Sulfato de potasio (R.A.).
- Solución de NaOH al 40%.
- Solución de HCl 0.01 N valorada.
- Mezcla digestiva (a).
- Solución de ácido bórico con indicadores (b).

(a) Disolver 3 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 20 mL de agua destilada, a continuación se agrega 50 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) y una vez que este bien disuelta la sal, se adiciona con mucho cuidado y resbalando por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico concentrado

(b) Se pesan 10 g de ácido bórico y se coloca en un matraz aforado de 1 litro, se adiciona 10 mL de verde de bromocresol y 7 mL de rojo de metilo y se afora a 1 L con agua destilada.

## Procedimiento.

### \*Digestión de la muestra:

- 1) Pesar de 10-100 mg de la muestra (dependiendo del contenido de proteína esperado) y colocarlos en el tubo de digestión.
- 2) Adicionar aproximadamente 0.5 g de  $K_2SO_4$ .
- 3) Adicionar 3 mL de mezcla digestiva.
- 4) Colocar el tubo en el digestor por 15 minutos a una temperatura menor de  $370^{\circ}C$ .
- 5) Sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar.
- 6) Adicionar 1.5 mL de  $H_2O_2$  al 30% y nuevamente colocar el tubo en el digestor que se encuentre a  $370^{\circ}C$  hasta que la digestión termine ( cuando el tubo no muestre manchas ni puntos negros y además la mezcla de digestión sea incolora, translúcida o verde-azuloso translúcido).
- 7) Dejar enfriar el tubo antes de destilar.

### \*Destilación y titulación:

Se lleva a cabo en el equipo Auto Analyzer Kjeltex, modelo 1030 de manera automática. La destilación se lleva a cabo por arrastre de vapor por acción de NaOH al 40%, se recibe el amoníaco liberado en ácido bórico y se titula con HCl 0.01 N valorado.

Se debe correr un blanco en donde se sustituye la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa, trabajándose en la misma forma.

## Cálculos.

Para obtener el contenido de nitrógeno de la muestra:

$$\%N_2 = (P-B) \cdot N \cdot \text{meq} \cdot 100 / m$$

Donde:

P = mL de solución de HCl valorada.

B = mL de la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de HCl .

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

m = peso de la muestra (en gramos).

Para obtener el contenido de proteína de la muestra se relaciona el contenido de nitrógeno determinado que está presente en la proteína de la muestra por medio de un factor:

$$\% \text{ Proteína} = \% N \cdot F$$

F = factor de conversión (6.25).

### 4.4.6 Hidratos de carbono asimilables por diferencia

Son los hidratos de carbono no fibrosos como los almidones y los azúcares. Si se suman los porcentajes de humedad, cenizas, proteínas, grasa cruda y fibra cruda y el total se resta de 100, se puede suponer que esta diferencia son los hidratos de carbono asimilables.

## 4.5 Determinación de taninos<sub>(19)</sub>

### Fundamento

El método se basa en la reducción del ión férrico debido a los polifenoles con la posterior formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, el cual es cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 525 nm.

## Reactivos

- Solución estándar de ácido tánico (2 g/L)

Pesar 2 g de ácido tánico y llevar a 1000 mL con agua en matraz aforado. Proteger de la luz. La solución sólo se puede almacenar por una semana.

- Solución de hidróxido de amonio (8 g/L  $\text{NH}_3$ )

De un reactivo de hidróxido de amonio con 28-30% de  $\text{NH}_3$  y una densidad de 0.896 g/L, se deben tomar 3.1 mL de hidróxido de amonio y llevar a 100 mL.

- Solución de dimetilformamida (DMF) (75% v/v)

Colocar 75 ml de DMF en un matraz aforado de 100 mL. Diluir con agua; permitir que la solución llegue a temperatura ambiente y después llevar al aforo.

- Solución de citrato férrico amoniacal (3.5 g/L)

Pesar 3.5g de citrato férrico amoniacal y llevar a 1000 mL con agua. El reactivo debe tener entre 17% y 20% de hierro (m/m). Se debe preparar 24 horas antes de su uso

NOTA: Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua deberá ser destilada.

## Equipo

Parrilla de agitación

Autoclave

Balanza analítica Sartorius Analytic

Centrífuga, capaz de producir una aceleración de 3000 r.p.m. DYNAC.

Espectrofotómetro Sequoia tumer

Estufa de vacío Lab-Line modelo 3620

Matraces volumétricos de 25, 100 y 1000 mL

Molino Thomas-Wiley Laboratory Mill Modelo 4

Pipetas automáticas (1-5 mL y 1-10 mL)

Tubos de centrifuga, con capacidad de 50 mL

Tubos de ensaye de 16 X 150 mm

Vórtex Supermixer 1290 Lab-Line Instrument

## Procedimiento

A) Determinación de taninos en la muestra: introducir 1 gramo de muestra en un tubo de centrifuga; usando una pipeta, agregar 25 mL de la solución de dimetilformamida. Tapar el tubo herméticamente y agitar 60 min.  $\pm$  1 min. usando un agitador magnético y una parrilla de agitación. Centrifugar durante 10 minutos, usando una aceleración de 3000 r.p.m.

Blanco: Remover 1 mL del sobrenadante líquido, usando una pipeta e introducirlo en un tubo de ensaye. Sucesivamente adicionar 6 mL de agua y 1 mL de solución amoniacal usando una pipeta y después agitar durante algunos minutos

Muestra: Remover 1ml del sobrenadante líquido con una pipeta e introducir en un tubo de ensaye. Sucesivamente adicionar 5 mL de agua y 1 mL de solución de citrato férrico amoniacal, agitar por algunos segundos; posteriormente adicionar con una pipeta 1 mL de la solución de amonio y agitar por algunos segundos.

Después de 10 minutos, medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 525 nm.

B)Preparación de la curva de calibración (con ácido tánico): Se preparan 8 matraces volumétricos de 25 mL y se usarán pipetas graduadas para adicionar respectivamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ml de la solución de ácido tánico, y se llevará hasta la marca de aforo con DMF. La escala de concentración así obtenida le corresponden los contenidos de ácido tánico de 0, 80, 160, 240, 320, 400, 480, 560  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

De cada uno de los matraces tomar 1 mL de solución e introducirlos en un tubo de ensaye. Añadir 5 mL de agua y 1 mL de citrato férrico amoniacal a cada tubo; agitar por unos segundos haciendo uso de un vortex. Añadir 1 mL de solución de hidróxido de amonio a cada tubo, agitar nuevamente con el vortex por unos segundos. A los 10 minutos, leer las absorbancias a una longitud de onda de 525 nm., ajustando el espectrofotómetro con un blanco de agua. Trazar una gráfica de absorbancia contra concentración de ácido tánico (expresado como  $\mu\text{g}$  de ácido tánico)

NOTA: La curva puede no pasar por el origen, sin embargo no deberá de ser corregida por el cero de la escala.

## Cálculos

A la absorbancia obtenida de la muestra se le resta la absorbancia de su blanco. La concentración de la muestra se lee a partir de la curva patrón hecha con ácido tánico y los resultados se expresan en microgramos de equivalentes de ácido tánico por mililitro. La concentración obtenida de la muestra se multiplica por el factor de dilución. El resultado se convierte de microgramos a miligramos.

### 4.6 Determinación semi-cuantitativa de alcaloides<sub>( 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 )</sub>

#### Reactivos para alcaloides

- 1) Reactivo de MAYER (cloruro de mercurio y yoduro de potasio)
- 2) Reactivo de WAGNER (triyoduro de potasio)
- 3) Reactivo de DRAGENDORFF (nitrato de bismuto y yoduro de potasio)
- 4) Reactivo de SONNENSCHNEIN (ácido fosfomolibdénico)
- 5) Reactivo de HAGER (ácido pícrico)
- 6) Reactivo de SCHEIBLER (ácido fosfotúngstico)
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTÉNICO

El precipitado formado con los reactivos varía en cantidad con los diferentes alcaloides ; en consecuencia, una estimación de la concentración de alcaloides a partir de la cantidad de precipitado con un reactivo es solamente aproximado.

#### Reactivos :

- 1) Reactivo de MAYER : Se disuelven 1.36 g de  $HgCl_2$  en 60 mL de agua y 5.0 g de KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos soluciones y se aforan a 100 mL con agua destilada.
- 2) Reactivo de WAGNER : Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua ; la solución se afora a 100 mL con agua destilada.
- 3) Reactivo de DRAGENDORFF : Se disuelven 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico (densidad 1.18, es decir el 30%) y 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora con agua 100 mL.
- 4) Reactivo de SONNENSCHNEIN : A 100 mL de una solución caliente de molibdato de amonio (43g/100mL), se le adicionan 100 mL de una solución caliente de fosfato de sodio dibásico anhidro (10 g/100 mL) a esta solución clara se adicionan 10 mL de ácido nítrico concentrado; al precipitado amarillo que se formó se deja

reposar durante una hora. Se decanta el líquido sobrenadante y se desecha; suspender el precipitado amarillo en 50 mL de agua destilada y calentar. A la suspensión caliente se le adicionan 100 mL de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28 g/100 mL). Se forma una solución clara y es evaporada en cápsula de sequedad; se flamea la superficie del polvo con un mechero bunsen hasta encenderse para evaporar las sales de amonio. Se pesa el polvo, y debe ser aproximadamente 30 g (si se realizó con las cantidades indicadas anteriormente). Se disuelve el polvo con 200 mL de agua destilada caliente. Se calienta y adicionan 50 mL de ácido nítrico concentrado; se adiciona agua destilada hasta llevar a un aforo de 300 mL, resultando una solución clara amarilla de ácido fosfomolibdico.

- 5) Reactivo de HAGER : Se prepara una solución acuosa saturada de ácido pícrico (2.0/100 mL).
- 6) Reactivo de SCHEIBLER : Se disuelven en 50 mL de agua 10 g de tungstato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se acidula con ácido nítrico.
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUNGSTÉNICO : Se disuelven 5.0 g de ácido silicotungstico en ácido sulfúrico (6N) necesario para formar 100 mL de solución.

### Procedimiento

Se pesan 2 g de muestra seca y molida y se mantiene toda la noche con 40 mL de metanol; a continuación se calienta durante 4 horas a 50°C (agitando intermitentemente). La mezcla es entonces filtrada, y el residuo es lavado con 20 mL de metanol y los extractos se combinan y se procede a evaporar el metanol en un rotavapor. El residuo es resuspendido con 2 mL de metanol y 12 mL de HCl al 1% ; la mezcla es agitada y filtrada ; para lavar el residuo se usan 8 mL de HCl al 1%, se combinan los extractos filtrados y se lleva a pH básico con amoníaco concentrado (aproximadamente al 25%). Se extrae con tres porciones de 20 mL de cloroformo dando la FRACCIÓN "A".

A la solución acuosa residual de la anterior extracción, se procede a extraerla con una mezcla de cloroformo-etanol (3 :2 v/v), con tres porciones de 20 mL cada una, con la cual se obtiene la FRACCIÓN "B".

Las fases orgánicas son lavadas con 5 mL de solución media saturada de sulfato de sodio y secada con sulfato de sodio anhidro.

Las dos fracciones A y B, son evaporadas en un rotavapor por separado y el residuo es resuspendido con 1.5 mL de HCl al 1% y 1.5 mL de cloroformo, agitando vigorosamente. La fase acuosa de cada fracción se filtra a través de algodón y se divide en 7 porciones; estas alícuotas son ensayadas con los siguientes 7 reactivos de alcaloides :

- 1) Reactivo de MAYER : El reactivo sólo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o  $H_2SO_4$  diluïdos. La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

- 2) Reactivo de WAGNER : La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados flocculentos color marrón.
- 3) Reactivo de DRAGENDORFF : Se usa sobre soluciones aciduladas. Se forma un precipitado anaranjado-marrón
- 4) Reactivo de SONNENCHEIN : Los alcaloides y sales de amonio dan precipitados amarillos.
- 5) Reactivo de HAGER : La mayoría de soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados color amarillo.
- 6) Reactivo de SCHEIBLER : La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.
- 7) Reactivo de ÁCIDO SILICOTUGSTENICO : La solución acidulada da un precipitado blanco-grisáceo.

### **Interpretación de resultados**

Debido a la frecuencia de reacciones falsas positivas con los reactivos comunes de alcaloides, sólo se considera como positiva la presencia de ellos en las muestras problemas cuando dan reacciones positivas con los siete reactivos anteriormente mencionados.

Hay que mencionar que para el caso del reactivo de HAGER (ácido pícrico) debido a su baja sensibilidad, cuando da una reacción negativa y todas las demás dan reacción positiva, este resultado se puede descartar considerando positiva la presencia de alcaloides en la muestra.

### **4.7 Determinación cuantitativa de alcaloides por HPLC**

Técnica descrita por la AOAC 1984 (16).

Esta determinación se le realizó a la materia prima (hoja de árbol de cacao), al producto elaborado (té de hoja de árbol de cacao) y a dos muestras de té que se encuentran en el mercado y se sabe que presentan algunas características similares al producto desarrollado como lo son la presencia de alcaloides (teobromina, teofilina y cafeína). Estos tés son los siguientes :

- Té negro, marca Therbal ; contenido de cada sobre : 1 g
- Té verde, marca Therbal ; contenido de cada sobre : 2 g

Es importante mencionar que la materia prima (hoja de cacao) fue previamente acidulada con ácido cítrico, mismo que se utilizó en la elaboración del producto para lograr la extracción de los alcaloides debido a las

condiciones alcalinas de éstos. La cantidad de ácido cítrico empleada fue de 0.4050 g., cantidad de ácido necesaria para obtener un pH=1

#### **Material / Reactivos**

- Balanza analítica Sartorius Analytic
- Ácido cítrico J.T. Baker
- Matraces erlenmeyer
- Agua destilada
- Agua desionizada
- Mechero bunsen
- Matraz volumétrico de 100 mL
- Matraz aforado de 100 mL
- Matraz de 200 mL
- Micropipetas con capacidad de 5-50  $\mu$ L, 5-200  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L
- Pipetas Pasteur
- Acrodiscos de nylon de 0.2 micras de tamaño de poro y 13 mm de diámetro. Gelman
- Papel filtro Whatman No. 1
- Metanol grado HPLC
- Ácido acético QP
- Sistema cromatográfico HPLC:

Tipo de columna : Waters Spherisorb<sup>®</sup> 5  $\mu$ m ODS2, 4.6 X 150 nm

Sistema de entrega de disolventes (2) modelo 510, Waters

Inyector Rheodyne con loop de 20  $\mu$ L

Detector UV-Vis Waters 486 ( $\lambda$  280 nm)

Controlador automático de gradiente modelo 680 Waters

Fase móvil : agua/ácido acético/metanol (72 :1 :27)

Velocidad de flujo de la fase móvil : 1 mL/min

Atenuación : 128

Velocidad del papel : 0.5 cm/min.

Ancho del pico (PW) : 3

Alto del pico (PT) : 1000

## **Extracción de alcaloides**

Pesar 1 g de muestra para los casos del té negro y té verde y 2 g de materia prima (hoja de cacao) y de té de hoja de cacao. A la materia prima se le agregó 0.4050 g de ácido cítrico. Posteriormente colocar la muestra en matraces erlenmeyer de 125 mL con perlas de ebullición y se agregan 50 mL de agua desionizada hirviendo. Se hierva durante 20 minutos. Se enjuaga y coloca en un matraz volumétrico de 100 mL. Se deja enfriar a temperatura ambiente (25°C) y se afora a 100 mL en los casos de té de hoja de cacao y hoja de cacao y a 200 mL en los casos de té verde y té negro; se agita y filtra por papel Whatman número 1. Se toman 20 mL los cuales se desengrasan con 10 mL de éter de petróleo. La fase acuosa se filtra por acrodiscos de nylon de 0.2 micras de tamaño de poro. De esta solución se inyectan los triplicados en HPLC. De cada muestra se realizan tres extractos.

## **Curva Patrón**

Se prepara una curva patrón con los tres alcaloides (cafeína, teobromina y teofilina), en un intervalo de concentración de 1 a 10 µg/mL, de fase móvil ( agua : ácido acético : metanol en proporción 72 : 1 : 27 ).

## **Cálculos**

Para calcular el contenido de alcaloides en las muestras se utilizan las áreas de los cromatogramas interpolando este valor en la curva patrón. (Ver curvas patrón en el Anexo 1)

## **4.8 Encuesta de consumo (Ver encuesta aplicada en el Anexo 3)**

La encuesta de consumo se aplicó a 100 personas afuera de supermercados.

Las preguntas se elaboraron con base en los datos que se deseaban obtener para la selección de la población, de las muestras y la preparación de las mismas para las pruebas posteriores.

Las preguntas fueron de dos tipos: abiertas y cerradas

## Resultados

Se calculó el promedio y el porcentaje de cada respuesta y se realizaron gráficas de cada pregunta en base a los porcentajes de las respuestas con el fin de conocer los porcentajes más altos de respuesta para la selección posterior de la población, la preparación y manejo de las muestras.

### 4.9 Elaboración del producto

El producto se elaboró bajo la siguiente formulación

Tabla No.1 Formulación del producto desarrollado

MATERIA PRIMA	CANTIDAD
HOJA DE CACAO	2.000 g
ÁCIDO CÍTRICO	0.4050 g
COLORANTE	0.00125 g
SABORIZANTE	0.00200 g

Debido a la característica alcalina que presentan los alcaloides (cafeína, teobromina y teofilina), no es posible la extracción de éstos en el agua, es por ello que se empleó el ácido cítrico. La cantidad de ácido cítrico empleada (0.4050 g) es la necesaria para obtener un pH=1, con el cual es posible la extracción de los mismos.

El colorante color chocolate y saborizante sabor chocolate empleados, con claves MP-403.02 y 559.109/TP respectivamente, fueron proporcionados por la empresa Pritz Internacional. Las proporciones utilizadas son las recomendadas por la misma empresa.

Todos los componentes en polvo, es decir, tanto la materia prima como los aditivos empleados se mezclaron y colocaron en las bolsitas de empaque.

#### **4.9.1 Empaque**

El empaque utilizado es un papel filtro proporcionado por la empresa "La Pastora", las características del mismo no fueron reveladas por la empresa.

Cada bolsita elaborada con dicho papel filtro, se diseñó con las dimensiones proporcionadas por los fabricantes de té; 5 cm de ancho y 6 cm de largo.

Las bolsitas se cosieron de cada lado a máquina con hilo de algodón blanco delgado y se les colocó en la parte superior un hilo de algodón blanco de 16cm de largo un poco más grueso, para facilitar la manipulación de la bolsita ; este hilo también se cosió a máquina.

#### **4.10 Evaluación sensorial**

Una vez que se diseñó la formulación del té de hoja de cacao, se evaluó el producto con consumidores, tomando como base la forma de consumo de té, que se obtuvo de la encuesta. Para este fin se realizaron dos pruebas sensoriales de tipo afectivo: una prueba de preferencia y una de nivel de agrado.

Las muestras empleadas en las pruebas de preferencia y nivel de agrado para comparar el producto elaborado son:

- Té negro, marca Therbal
- Té verde, marca Therbal
- Té de manzanilla, marca Therbal
- Té de hoja de cacao (producto desarrollado)

Las muestras se seleccionaron en base a lo siguiente : el té negro y el té verde son dos tipos de té comerciales que al igual que el té desarrollado presentan los alcaloides cafeína, teobromina y teofilina ; el té de manzanilla se seleccionó debido a que en la encuesta de consumo resultó ser el té más consumido por la población representativa.

#### 4.10.1 Prueba de preferencia (30) (Ver hoja de respuestas en el Anexo 4)

El objetivo de esta prueba es ordenar, según las opiniones de un grupo de consumidores, la preferencia o agrado de las muestras presentadas para poder posicionar el producto desarrollado.

Cada muestra se colocó en un vaso de unicel de 250 mL de capacidad. Se añadieron 100 mL de agua caliente y se dejó remojar la bolsita por un periodo de entre 4 y 5 minutos.

Después de este tiempo las bolsitas se retiraron de los vasos.

A cada vaso se le colocó una clave de identificación :

Tabla No. 2 Codificación de los tes para la prueba de preferencia

TE	CLAVE
NEGRO	126,184
VERDE	450,317
MANZANILLA	525,485
HOJA DE CACAO	721,201

Las 4 muestras se presentaron al consumidor al mismo tiempo junto con su hoja de respuestas para que colocaran el número correspondiente a cada muestra dependiendo de su preferencia. El número 1 correspondió al de mayor agrado y el 4 al de menor preferencia.

#### Resultados

El análisis de resultados se realizó mediante un análisis de ordenamiento por rangos. Posteriormente se obtuvo la suma de rangos y a continuación se realizaron las diferencias absolutas entre la suma de rangos. Se tomaron los valores teóricos de tablas estadísticas para nivel de significancia del 5 y 1% para 100 jueces y 4 muestras (Ver tablas en el Anexo 4). Los datos teóricos de tablas se compararon con la diferencia absoluta entre la suma de rangos para determinar si existía o no diferencia significativa

#### 4.10.2 Prueba de nivel de agrado (30) (Ver hojas de respuestas en el Anexo 4)

El objetivo de esta prueba es conocer el nivel de agrado que provocan una serie de muestras, tomando en cuenta diferentes atributos de cada una de ellas.

Las muestras analizadas son:

- Té negro
- Té verde

- Té de manzanilla
- Té de hoja de cacao

Los atributos calificados son:

- Aroma
- Color
- Sabor
- Agrado en general

La realización de esta prueba se llevó a cabo de la siguiente manera: cada muestra se colocó en un vaso de unicel de 250 mL de capacidad. Se añadieron 100 mL de agua caliente y se dejó remojar la bolsita por un periodo de entre 4 y 5 minutos.

Después de este tiempo las bolsitas se retiraron de los vasos.

A cada vaso se le colocó una clave de identificación de acuerdo a la tabla 3

Tabla No. 3 Codificación de los tes para la prueba del nivel de agrado

TÉ	CLAVE
NEGRO	126,184
VERDE	450,317
MANZANILLA	525,485
HOJA DE CACAO	721,201

Las 4 muestras se presentaron al consumidor al mismo tiempo junto con sus respectivas hojas de respuestas.

Se utilizó una escala hedónica, también conocida como no estructurada, colocándose los descriptores de la escala a los extremos de esta y un punto medio.

## Resultados

El análisis estadístico para esta prueba se llevó a cabo de la siguiente manera: en primer lugar se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para observar si existía diferencia significativa entre las cuatro muestras evaluadas en el nivel de agrado en general y el resto de los atributos (aroma, color y sabor). El nivel de significancia fue de  $\alpha = 0.05$ . Paralelamente se realizó la Prueba LSD (Least Significant Difference) que muestra las medidas que pueden ser consideradas estadísticamente diferentes.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla No.1 se presentan los resultados del análisis proximal realizado a la cáscara de cacao del fruto del árbol del cacao en base húmeda, sin embargo, para llevar a cabo un mejor análisis de los mismos, en la tabla No.2 se presentan los resultados en base seca, en donde se observa que la muestra presenta un alto contenido de carbohidratos y fibra principalmente. El contenido de cenizas y proteína es relevante.

De acuerdo al análisis proximal, el contenido de proteína de la cáscara del fruto del cacao es similar al de algunos cereales como el maíz y el arroz.

**Tabla No. 1**  
**ANÁLISIS PROXIMAL DE LA CÁSCARA DEL FRUTO DEL CACAO**  
**BASE HÚMEDA**  
**(g/100 g de muestra)**

TRATAMIENTO	HUMEDAD TOTAL	PROTEÍNA	CENIZAS	GRASA	FIBRA	CARBOHIDRATO*
SECADO EN ESTUFA	93.8	0.56 ± 0.0067	0.84 ± 0.0095	0.02 ± 0.0072	1.32 ± 0.043	3.43 ± 0.052

Valor promedio ± D.E. (n=3)

C.V. < 7.5%

\* Los carbohidratos fueron determinados por diferencia

**Tabla No. 2**  
**ANÁLISIS PROXIMAL DE LA CÁSCARA DEL FRUTO DEL CACAO**  
**BASE SECA**  
**(g/100 g de muestra)**

TRATAMIENTO	PROTEÍNA	CENIZAS	GRASA	FIBRA	CARBOHIDRATOS*
SECADO EN ESTUFA	9.10 ± 0.108	13.69 ± 0.156	0.34 ± 0.011	21.43 ± 0.698	55.40 ± 0.863

Valor promedio ± D.E. (n=3)

C.V. < 7.5%

\* Los carbohidratos fueron determinados por diferencia

En la tabla No.3 se encuentran los resultados del contenido de taninos encontrados en la cáscara del fruto del cacao, en donde se observa que el contenido de taninos en la hoja del árbol del cacao es menor al de la cáscara del fruto del árbol del cacao.

El contenido de taninos en la hoja del árbol del cacao se encuentra por debajo de los valores teóricos reportados en el té verde y el té negro.

**Tabla No. 3**  
**CONTENIDO DE TANINOS EN LA CÁSCARA DEL FRUTO, EN LA HOJA DEL**  
**ÁRBOL DEL CACAO, EN EL TÉ VERDE Y EN EL TÉ NEGRO**  
**(g/100 g de muestra)**

TRATAMIENTO	CÁSCARA DEL FRUTO DEL CACAO	HOJA DEL ÁRBOL DEL CACAO	TÉ VERDE <sup>*(31)</sup>	TÉ NEGRO <sup>** (32)</sup>
SECADO EN ESTUFA	0.859 ± 0.114	0.099 ± 0	2-3	10

Valor promedio ± D.E. (n=3)

C.V. < 2.6%

\* <http://www.correofarmacologico.com/edicion/noticia/0,2458,419682,00.html>

\*\* <http://www.herbogeminis.com/información>

En el análisis semi-cuantitativo de alcaloides, primeramente se analizaron tres diferentes concentraciones de cafeína, como se muestra en la tabla No. 4, con el fin de corroborar que este alcaloide da prueba positiva con el método propuesto, las cuales dieron como resultados pruebas positivas, aunque en las tres diferentes concentraciones el reactivo de Hager (ácido pícrico) dio reacción negativa. Las pruebas se consideraron positivas, ya que éste es un reactivo de baja sensibilidad, por lo que puede ser descartado si el resto de los reactivos dan reacciones positivas. La teobromina y teofilina son alcaloides (xantinas) con estructura semejante a la cafeína, por lo que únicamente se realizó la prueba con cafeína.

Posteriormente se analizó la cáscara de cacao, en la cual se observa que las siete reacciones son negativas, como se muestra en la tabla No. 5. Por esto, se agregó ácido cítrico para lograr la extracción de los alcaloides debido a la característica alcalina de los mismos; sin embargo la prueba resultó negativa. De igual forma se analizó la cascarilla del fruto del cacao, observándose que al igual que el caso anterior, las pruebas resultaron negativas, como se muestra en la tabla No. 6. Lo anterior indica la ausencia de alcaloides en la cáscara y cascarilla del fruto del cacao.

Debido a los resultados obtenidos se realizó la prueba con la hoja del árbol del cacao, que se sabe también presenta alcaloides<sub>(33)</sub>, sin embargo la prueba resultó ser negativa, como se muestra en la tabla No. 7; a esta muestra se le agregó ácido cítrico para lograr la extracción de los alcaloides, proceso que sí se llevó a cabo ya que la prueba fue positiva.

### Análisis semi-cuantitativo de alcaloides

Tabla No. 4 Reacciones de la cafeína con los reactivos de alcaloides

Reactivos	Cafeína		
	5 mg / 10 mL	50 mg / 10 mL	500 mg / 10mL
Mayer	+	+	+
Wagner	+	+	+
Dragendorff	+	+	+
Sonnenschein	+	+	+
Hager	-	-	-
Scheibler	+	+	+
Acido Silicotugsténico	+	+	+

Tabla No. 6 Reacciones de la cascarilla del fruto del cacao con los reactivos de alcaloides

Reactivos	Cascarilla de Cacao	Cascarilla de Cacao con ácido cítrico
	Reacción	
Mayer	-	-
Wagner	-	-
Dragendorff	-	-
Sonnenschein	-	-
Hager	-	-
Scheibler	-	-
Acido Silicotugsténico	-	-

Tabla No.5 Reacciones de la cáscara del fruto del cacao con los reactivos de alcaloides

Reactivos	Cáscara de cacao	Cáscara de Cacao con ácido cítrico
	Reacción	
Mayer	-	-
Wagner	-	-
Dragendorff	-	-
Sonnenschein	-	-
Hager	-	-
Scheibler	-	-
Acido Silicotugsténico	-	-

Tabla No. 7 Reacciones de la hoja y té de cacao con los reactivos de alcaloides

Reactivos	Hoja de Cacao	Hoja de Cacao con ácido cítrico	Té de hoja de Cacao
	Reacción		
Mayer	-	+	+
Wagner	-	+	+
Dragendorff	-	+	+
Sonnenschein	-	+	+
Hager	-	-	-
Scheibler	-	+	+
Acido Silicotugsténico	-	+	+

Es importante mencionar que de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis semi-cuantitativo de alcaloides, en donde no se observó la presencia de estos en la cáscara del fruto del cacao y a la apariencia física desagradable que presentó ésta al ser hidratada, se decidió no desarrollar el producto con la cáscara del fruto del cacao.

También en base al análisis semi-cuantitativo de los alcaloides, en donde sí se observó la presencia de los mismos y en base a la apariencia agradable de la hoja del árbol del cacao al ser hidratada, se decidió trabajar con ella en el desarrollo del producto.

Una vez que se comprobó la presencia de alcaloides en la hoja, se llevó a cabo la cuantificación de estos por HPLC.

En base a la Norma Mexicana( 34 ) para este tipo de productos en donde se permite la adición de algunos aditivos, se decidió la incorporación de algunos de éstos, como se muestra en la tabla No. 8.

- **ÁCIDO CÍTRICO** : Se utilizó para lograr la extracción de los alcaloides (cafeína, teobromina y teofilina) en el agua, debido a que como se mencionó anteriormente en la metodología, éstos presentan una característica básica que no les permite su extracción en el agua; y además le imparte un sabor agradable a la infusión.
- **SABORIZANTE** : (Sabor chocolate). Se empleó un saborizante ya que la hoja del árbol del cacao no proporcionó una intensidad de sabor importante.  
Se eligió el sabor chocolate, ya que siendo un té de la hoja del árbol del cacao, se relaciona éste con dicho sabor por los antecedentes del grano del fruto del cacao, en donde éste se ha empleado comúnmente para la elaboración del chocolate, usualmente consumido por nuestra población, todo esto para obtener una mejor aceptación por parte del consumidor.
- **COLORANTE** : (Color chocolate). Se decidió el empleo de un colorante en el desarrollo del producto ya que el color que presentaba la materia prima en el agua era muy tenue y se buscó con el color chocolate intensificarlo un poco con el fin de obtener un mejor nivel de agrado en el consumidor.

**Tabla No. 8**  
**Formulación de té de hoja**  
**del árbol del cacao**

Hoja de Cacao	2.0 g
Ácido Cítrico	0.4050 g
Colorante *	0.0012 g
Saborizante**	0.002 g

\* Color chocolate

\*\* Sabor chocolate

Es posible observar en la tabla No. 9, que en cuanto al contenido de teobromina, el té negro es el que contiene una mayor cantidad de este alcaloide, posteriormente el té verde y finalmente con una diferencia importante se encuentran el té de hoja del árbol del cacao y la materia prima de éste. En el caso de la teofilina, se encontró una mayor cantidad de dicho alcaloide en el té negro, sin embargo no se encontró teofilina en el té verde y con una diferencia importante en comparación con el té negro, se encontró al producto desarrollado y a la materia prima de éste. Finalmente, con respecto a la cafeína, se observa que el té verde presentó mayor cantidad de este alcaloide, posteriormente se encontró al té negro y finalmente también con una diferencia importante, al té de hoja del árbol del cacao y a la materia prima.

Con todo esto se observa que el producto desarrollado y la materia prima presentaron en comparación con los dos tes comerciales, menor cantidad de alcaloides, sin embargo sí se encuentran presentes.

En el Anexo 2 se muestran ejemplos de cromatogramas de la curva patrón así como de las muestras analizadas.

**Tabla No. 9**  
**Contenido de teobromina, teofilina y cafeína en té negro, té verde, té de hoja de cacao y hoja de cacao acidulada**

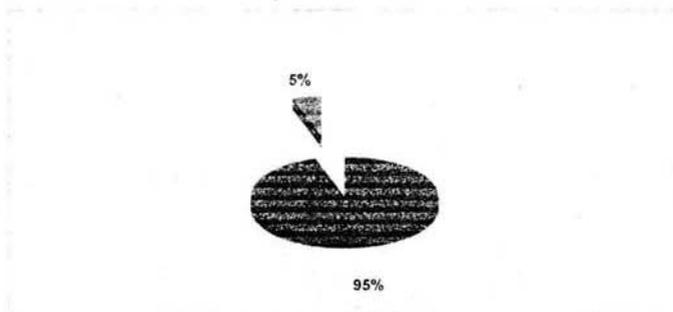
	Alcaloides (mg/100g de muestra)		
	Teobromina	Teofilina	Cafeína
<b>Té negro</b>	392.63 ± 4.09	199.28 ± 0.46	2942.20 ± 39.56
<b>Té verde</b>	216.55 ± 0.31	ND	3685.62 ± 0.30
<b>Té de hoja de cacao</b>	51.63 ± 0.37	19.82 ± 0.31	12.19 ± 0.02
<b>Hoja de cacao acidulada (materia prima)</b>	49.65 ± 0.15	20.36 ± 0.21	14.71 ± 0.12

n=3

C.V. < 2%

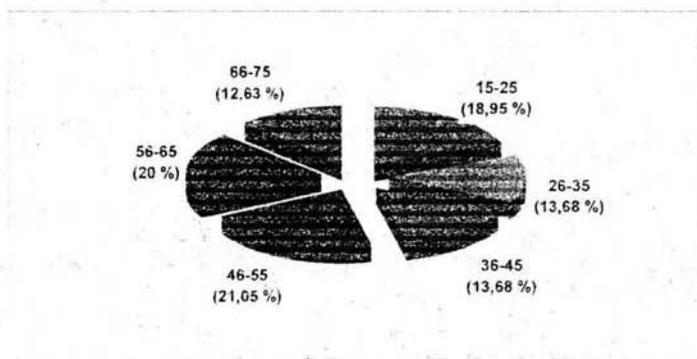
En la encuesta de consumo, se encuestaron 100 consumidores, siendo el 77 % mujeres y el 23 % hombres

**Gráfica No.1 Consumo habitual de té**



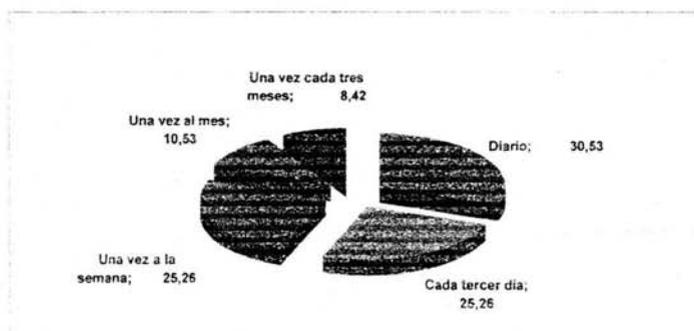
De los 100 consumidores encuestados, el 95 % era consumidores habituales de té y el 5 % restante indicó no consumirlo (ver gráfica No. 1)

**Gráfica No. 2 Distribución por edades**



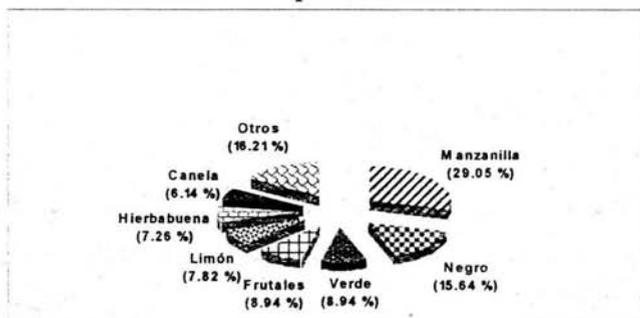
En la gráfica No. 2 se observa la distribución de edades de los 100 consumidores participantes. Con estos datos se buscó aplicar las pruebas sensoriales posteriores a un rango de edades de entre 46 a 65 años principalmente, aunque se podían considerar los otros rangos de edad.

**Gráfica No. 3 Frecuencia de consumo de té**



El consumo de té fue alto, ya que el 30 % lo hace diariamente y otro 25.2 % cada tercer día (ver gráfica No.3)

**Gráfica No. 4 Tipos de tes consumidos**



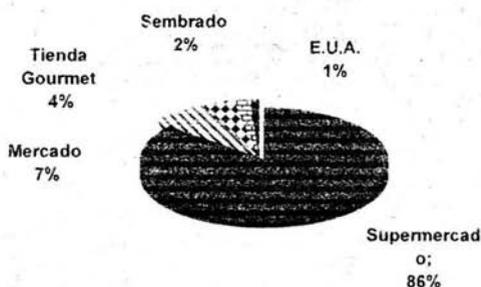
**Tabla No. 10 Tipos de tes consumidos**

¿Qué tipo de té consumes?	%
Manzanilla	29,05
Negro	15,64
Verde	8,94
Frutales	8,94
Limón	7,82
Hierbabuena	7,26
Canela	6,14
Doce flores	2,23
Tila	2,23
Anís	1,67
Herbales	1,67
Azúcar	1,67
Natural	1,67
Jamaica	1,12
Manzana con canela	1,12
Anís con manzanilla	0,56
Menta	0,56
Campechano	0,56
Hinojo	0,56
Tlacualalache	0,56

Los consumidores indicaron consumir principalmente el té de manzanilla, negro y verde (ver gráfica No. 4); siendo el té negro y el té verde los tes con los que se comparan nuestro producto por el contenido de los alcaloides cafeína, teobromina y teofilina. Por estos resultados se decidió aplicar las siguientes pruebas sensoriales, tomando en cuenta estos tres tes de mayor consumo y el té verde y negro con características semejantes a nuestro producto.

En la tabla No. 10, se muestran todos los tipos de tes mencionados, observándose que de los veinte tipos mencionados, más del 50 % presentaron una frecuencia de mención por parte de los consumidores menor al 5%.

**Gráfica No. 5 Lugares de compra de tes**



Los mayores lugares de compra son los supermercados y mercados (ver gráfica No. 5).

La pregunta "¿dónde lo compras?" se realizó únicamente con el fin de saber en dónde podría ser comercializado nuestro producto, es decir, esta pregunta no fue considerada para el desarrollo del presente trabajo.

Las presentaciones comercializadas son en bolsitas y como infusión suelta, siendo la presentación en bolsita la que más se compra, lo cual fue indicado por el 72.03 % de los consumidores.

Los consumidores indicaron consumir el té por su sabor (52 %), por la sensación que produce, es decir, estimulante, digestiva, relajante, etc (42 %) principalmente, el valor nutricional no es una característica muy importante, sólo lo mencionó el 1.6 %

El 53 % de los consumidores indicaron que tomaban el té con azúcar y el resto lo consume sin azúcar, es decir, no hay una diferencia importante entre el consumo de té con y sin azúcar por los consumidores, sin embargo las pruebas sensoriales posteriores se llevaron a cabo sin la complementación de azúcar para evitar un enmascaramiento del sabor.

El 81.05 % de los consumidores indicaron que comprarían el té de cacao si existiera en el mercado, lo cual podría indicar que el producto sería aceptado en el mercado como un nuevo producto.

La prueba de preferencia se llevó a cabo con 100 consumidores habituales de té, siendo el 77 % mujeres y el 23 % hombres, de edades de 17 a 74 años.

**Tabla No. 11 Frecuencia acumulada de la prueba de preferencia**

Muestras de Té	Frecuencia acumulada
Té de hoja de Cacao (A)	113
Té de manzanilla (B)	316
Té negro (C)	195
Té verde (D)	375

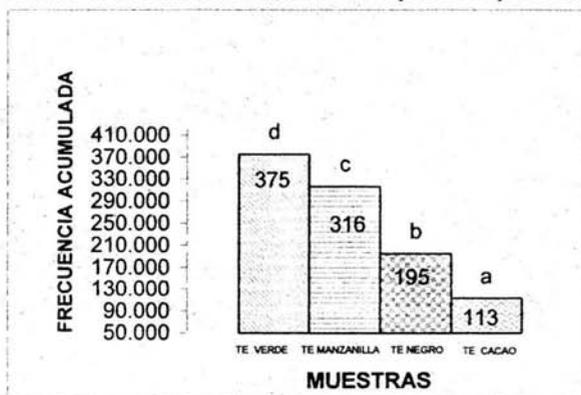
**Tabla No. 12 Análisis de rangos de los datos de la prueba de preferencia**

	Valor teórico de tablas nivel de significancia 1%	Valor teórico de tablas nivel de significancia 5%	Diferencia significativa
IA-BI =  1113-316  = 203	> 57	47	Sí
IA-CI =  1113-195  = 82	> 57	47	Sí
IA-DI =  1113-375  = 262	> 57	47	Sí
IB-CI =  316-195  = 121	> 57	47	Sí
IB-DI =  316-375  = 59	> 57	47	Sí
IC-DI =  195-375  = 180	> 57	47	Sí

n=100

4 muestras

Gráfica No. 6 Frecuencia acumulada de la prueba de preferencia



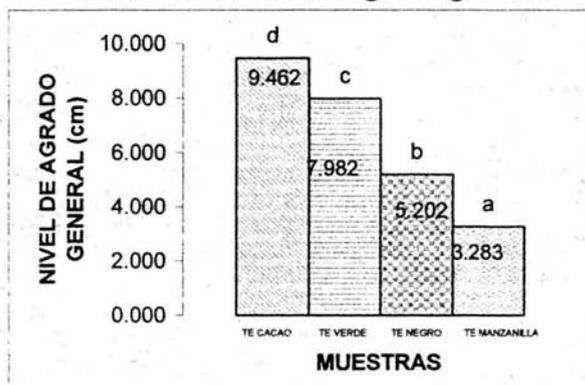
a, b, c, d indican que existe diferencia estadísticamente significativa en la preferencia de las muestras

Como se puede observar en la gráfica No.6, con un  $\alpha=0.01$  y  $\alpha=0.05$ , se encontró diferencia estadísticamente significativa en la preferencia de los consumidores por los cuatro tipos de tes evaluados.

Considerando la puntuación sensorial alcanzada, la muestra que más gustó fue la de té de hoja de cacao (A), ya que fue seleccionada en primer lugar mayor número de veces, es decir, alcanzó la menor puntuación numérica ya que la mayor cantidad de encuestados le otorgó el número 1 (primer lugar) y la que fue menos aceptada es la de té de manzanilla (B), ya que alcanzó la mayor puntuación numérica porque fue seleccionada mayor número de veces con el número 4 (cuarto lugar), como se observa en la Tabla No. 11.

La prueba de Nivel de Agrado se aplicó a 100 consumidores con un rango de edad de 17 a 74 años, considerada ésta, la población base. En el anexo No. 4 se encuentran las tablas obtenidas de los resultados estadísticos (ANOVA y LSD) de la prueba de nivel de agrado.

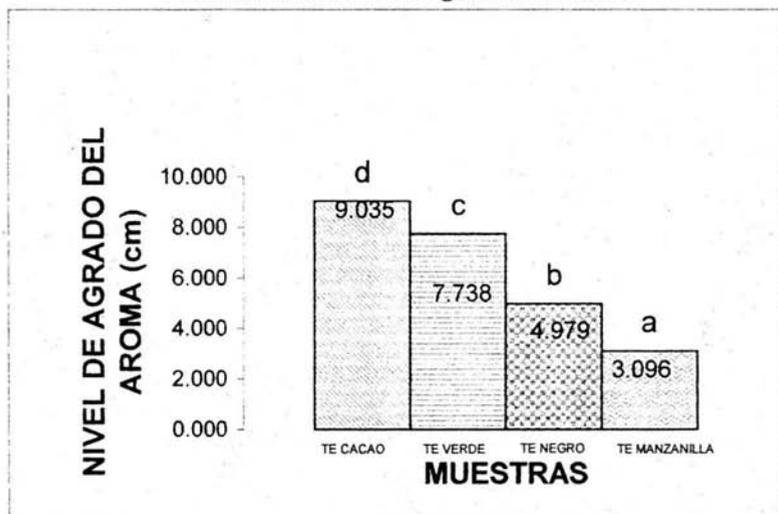
**Gráfica No. 7 Nivel de agrado general**



a, b, c, d indican que existe diferencia estadísticamente significativa en la preferencia de las muestras

En cuanto al nivel de agrado general se obtuvo un análisis de varianza de 0.0000 lo que nos indica que sí existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras. En el análisis LSD se observó que la diferencia que existe es entre todas las muestras, siendo la muestra de té de cacao la que más gustó y la de manzanilla la que menos gustó, como lo se observa en la gráfica No. 7.

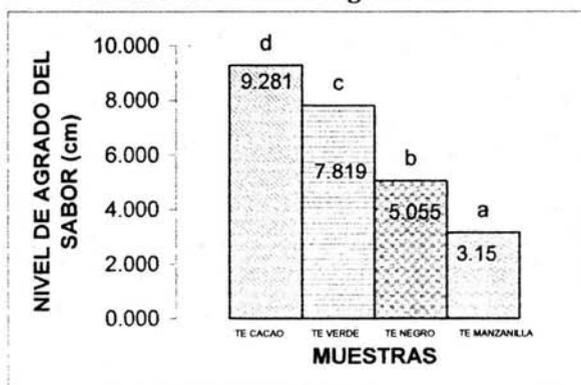
**Gráfica No. 8 Nivel de agrado del aroma**



a, b, c, d indican que existe diferencia estadísticamente significativa en la preferencia de las muestras

En relación al nivel de agrado del aroma de las muestras, el análisis de varianza también fue de 0.0000, por lo tanto sí existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras y así mismo el análisis LSD mostró que la diferencia es entre todas las muestras, como lo muestra la gráfica No. 8, en donde la muestra con mayor nivel de agrado en cuanto al aroma fue la del té de cacao y la de menor nivel de agrado fue la de manzanilla.

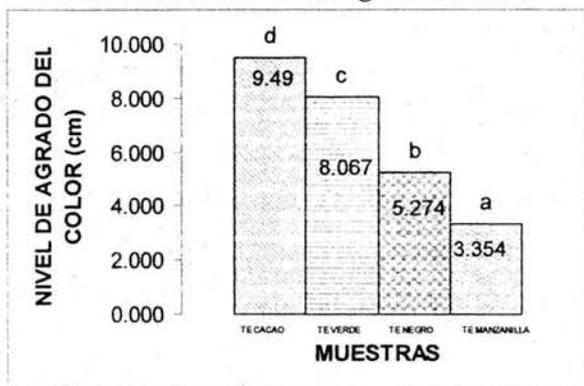
**Gráfica No. 9 Nivel de agrado del sabor**



a, b, c, d indican que existe diferencia estadísticamente significativa en la preferencia de las muestras

El nivel de agrado del sabor presentó un análisis de varianza del 0.0000, por lo que existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras y como se observa en la gráfica No. 9, el LSD presentó que la diferencia es entre todas las muestras, siendo la de mayor agrado la del té de cacao y la de menor agrado la de manzanilla.

**Gráfica No. 10 Nivel de agrado del color**



a, b, c, d indican que existe diferencia estadísticamente significativa en la preferencia de las muestras

El análisis de varianza para el nivel de agrado en cuanto a color fue de 0.0000, lo que indica que también existe diferencia estadísticamente significativa y el LSD mostró que la diferencia es entre todas las muestras, siendo la muestra de cacao la que más gustó y la de manzanilla la que menos agradó, este resultado se observa en la gráfica No. 10.

Así mismo cabe mencionar que los análisis estadísticos también fueron aplicados considerando dos rangos de edad como grupos independientes (de 17 a 35 años y de 36 a 74 años), en donde los resultados tanto de la ANOVA como el del LSD fueron los mismos que en los que aquí se muestran para la población general, de 17 a 74 años, es decir, que independientemente de la edad, la muestra que más gustó fue la de cacao y la de menor agrado fue la de manzanilla.

Por todo esto, el análisis estadístico de la prueba de nivel de agrado mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre las cuatro muestras evaluadas, es decir entre los tres tes comerciales y el producto desarrollado. También se observó que existe diferencia estadísticamente significativa entre las cuatro muestras en cada uno de los atributos estudiados (aroma, sabor, color y agrado en general).

La prueba de nivel de agrado confirmó la prueba de preferencia en donde el té desarrollado obtuvo el primer lugar de preferencia.

## 6.CONCLUSIONES

- Se encontró un alto contenido de carbohidratos y fibra en la cáscara del fruto del cacao.
- No se encontró presencia de alcaloides en la cáscara y en la cascarilla del fruto del cacao.
- Se detectó la presencia de cafeína, teobromina y teofilina por los métodos semi-cuantitativo y cuantitativo en la hoja del árbol del cacao.
- El contenido de cafeína, teobromina y teofilina en la hoja del árbol del cacao es de 12.19, 51.63 y 19.82 mg/100 g de muestra respectivamente.
- Se logró el desarrollo de una infusión tipo té a base de la hoja del árbol del cacao.
- El contenido de cafeína, teobromina y teofilina en la hoja del árbol del cacao y en el producto desarrollado fue menor al encontrado en los dos tes comerciales.
- El té desarrollado obtuvo el primer lugar de preferencia por encima del té de manzanilla, del té verde y del té negro.
- El producto desarrollado fue el que más gustó en la prueba de nivel de agrado en comparación con tes comerciales (manzanilla, verde y negro).
- Desde el punto de vista sensorial, en base a las dos pruebas aplicadas a consumidores, es un proyecto viable colocar en el mercado el producto desarrollado, ya que fue el té que más se prefirió y gustó en relación a otros ya existentes.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. De la Vega, A., Sotelo, A.; (1985). Estudio comparativo de la composición química del cacao y dos theobromas silvestres. Rev. Soc. Quim. Vol. 29, No. 5. México.
2. Alvarez, R.; (1990). Composición química de Theobromas silvestres y su comparación con el cacao (*Theobroma cacao L.*). TESIS. Escuela de Química. Universidad La Salle. pp. 1-36
3. Zapian, M; (1990). Determinación de teobromina y cafeína en productos comerciales de cacao por cromatografía de líquidos de alta presión. TESIS. Escuela de Química. Universidad La Salle. pp. 2-101
4. Nosti, J.; (1972). Cacao, Café y Té. Salvat. Ed. Barcelona.
5. Peña, E.; (1963). Producción y beneficio del cacao. Ed. Banco de Méx. S.A. México.
6. Rohan, T.; (1964). El beneficiado del cacao bruto. F.A.O. Italia
7. Wood.; (1970). Cacao. CECSA. México.
8. Miranda, F.; (1976). La Vegetación de Chiapas. Ed. Del Gob. del Edo. México.
9. Secretaría de Agricultura y Recursos Agropecuarios (SAGARPA); Centro de Estadística Agropecuaria; (2003)
10. CONADECA. Comisión Nacional del Cacao.; (1986). Proyecto: Deficiente Calidad y Beneficio del Cacao en el Soconusco.
11. Kirk y Othmer. (1979). Enciclopedia of Chemical Technology. Ed. John Wiley and Sons. USA.
12. Miranda, S.; (1988). Desarrollo de un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para medir cafeína, teobromina y teofilina en cafés comerciales. TESIS. Facultad de Química. UNAM. pp. 25-35
13. Goodman, G.; A.S. Goodman L.W. Rall. (1986). Bases farmacológicas de la terapéutica. 7ª. ed. Ed. Panamericana. México.

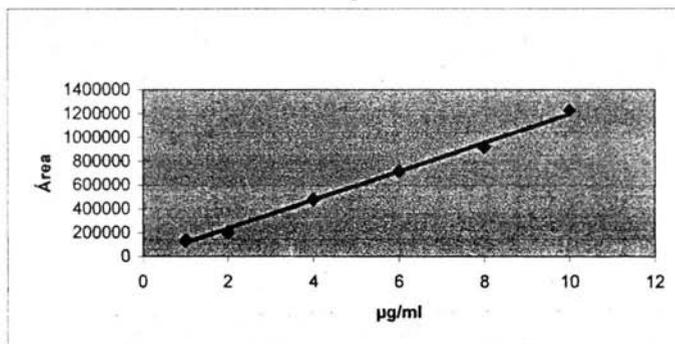
14. Litter, M.; (1977). *Farmacología Experimental y Clínica*. 5ª ed. Ed. Botas. México.
15. Bowman, W.; Rand, M.; (1984). *Farmacología bases bioquímicas y patológicas, Aplicaciones*. 2ª ed. Ed. Panamericana. México
16. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemist. (1984). 14 ed. Ed. Arlington. Virginia. USA.
17. Johnson, L.; Eds. (1978) *Basic Liquid Chromatography*. Varian Associates. Inc. Palo Alto. California. USA.
18. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. (1990) 15<sup>th</sup> edition. Published by AOAC, Inc Helrich (editor) Arlington.
19. International Standard; ISO 9648; (1988). first edition; Sorghum- Determination of Tannin Content.
20. Abisch, E. and Reichstein, T.; (1969). Alkaloid-screening (Micromethod) *Helv. Chim. Acta*, 43, 1844-1861
21. Domínguez, X. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. México. 211-228.
22. Farnsworth, N. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.*, 55, 245-256
23. Farnsworth, N. et al. (1962). Studies on false-positive alkaloid reactions with Dragendorff's Reagent. *Lloydia*, 25, 312-319
24. Haborne, J.; (1970). *Phytochemical Methods*. Ed. Chapman and Hall. London. 182-193
25. Hultin, E. and Tursell, K.; (1965). Alkaloid-screening of Swedish plants. *Phytochemistry*, 4, 425-433.
26. Martello, R. and Farnsworth, N.; (1962). Observations on the sensitivity of several common alkaloid precipitatin reagents. *Lloydia*, 25, 176-185.

27. Munch, J. and Pratt, H.; (1934). Alkaloidal reagents, V. The Aconite alkaloids. J. Am. Pharm. Assoc., 23, 96-973.
28. Winek, C. and Fitzgerald, Y.; (1961). Test of amino acids with alkaloidal reagents. J. Pharm. Sci. 50, 976
29. Willaman, J. and Schubert, B. (1955). Alkaloid Hunting. Econ. Botany, 9, 141- 150.
30. Pedrero, F.; Pangborn, R.; (1989). Evaluación sensorial de los alimentos, Métodos Analíticos. Alambra Mexicana. México. pp. 103-107; 237-241.
31. <http://www.correofarmaceutico.com/edicion/noticia/0,2458,419682,00.html>. Consultado el 8 de febrero de 2004, 19:56.
32. <http://www.herbogeminis.com/informacion> Consultado el 8 de febrero de 2004, 20:20.
33. Sotelo, A. and Alvarez, R.; (1991); Chemical Composition of Wild *Theobroma* Species and Their Comparison to the Cacao Bean. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 39, No. 11
34. Norma Mexicana. NMX-F-601-NORMEX-2002. Alimentos - Alimentos para Humanos-. Tes y sus variedades: Anís, Verde, Azhar, Canela, Jamaica, Limón, Manzanilla, Negro, Tila-Hierbabuena, Hierbabuena, Naranja y Mezclas de Tés. (2002).

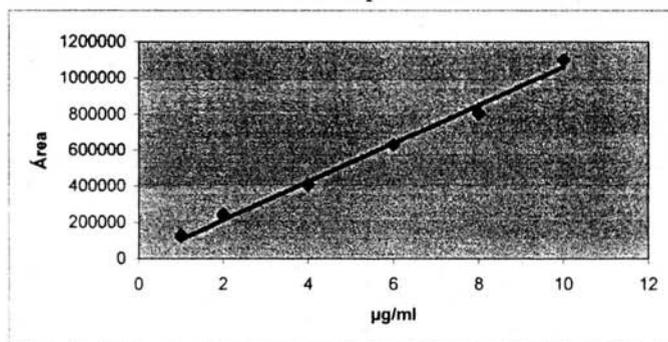
## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1 Curvas patrón de alcaloides

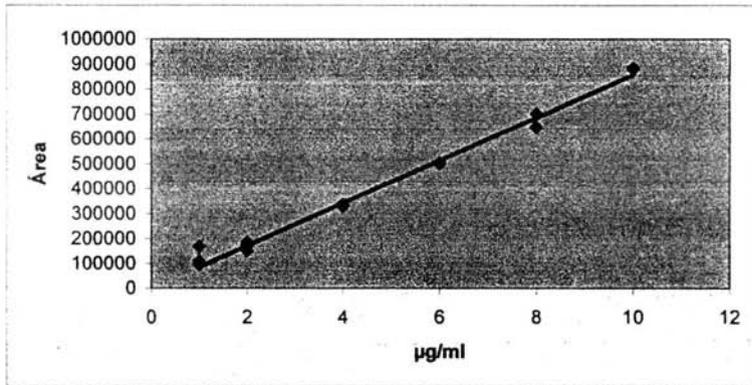
Gráfica No. 11 Curva patrón de teobromina



Gráfica No. 12 Curva patrón de teofilina

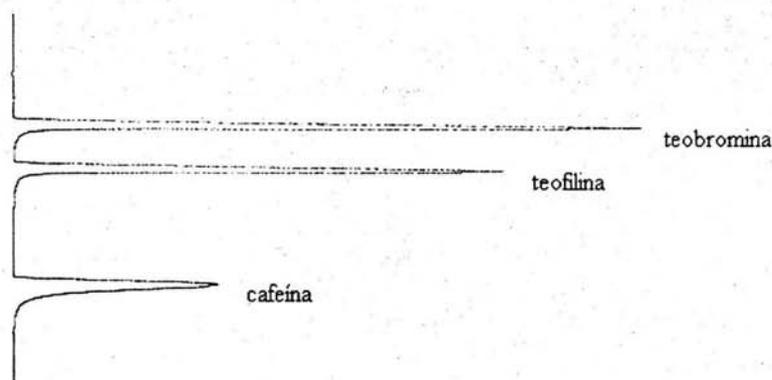


Gráfica No. 13 Curva patrón de cafeína



## 8.2 Anexo No. 2 Cromatogramas

### Cromatograma de curva patrón



Columna: Waters Spherisorb 5  $\mu\text{m}$  ODS2  
4.6 X 150 mm.

Fase móvil: agua/ácido acético/metanol (72:1:27)

Velocidad de flujo: 1 ml/min

Atenuación: 128

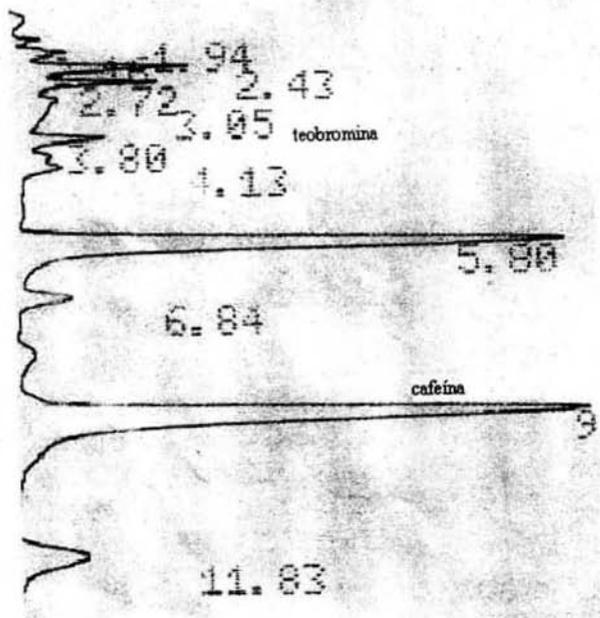
Velocidad del papel: 0.5 cm/min

Ancho del pico (PW): 3

Alto del pico (PT): 1000

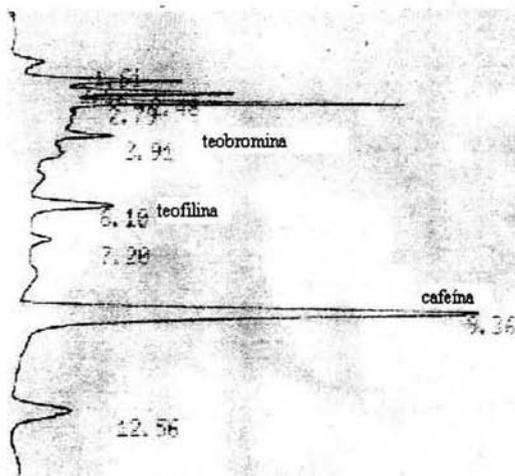
Concentración de alcaloides: 10  $\mu\text{g/ml}$

# Cromatograma de extracto de té verde



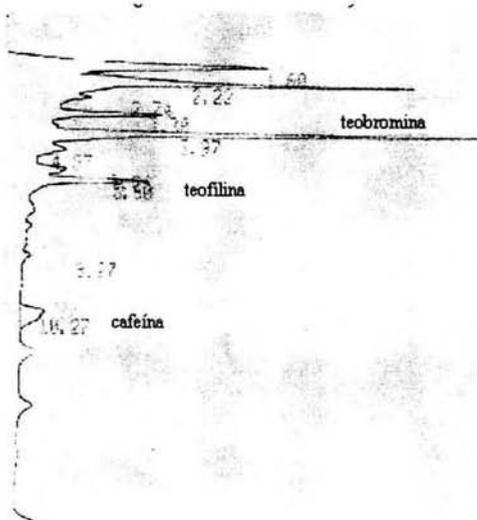
Columna: Waters Spherisorb 5  $\mu$ m ODS2  
4.6 X 150 mm Analytical Column  
Fase móvil: agua/ácido acético/metanol (72:1)  
Velocidad de flujo: 1 ml/min  
Atenuación: 128  
Velocidad del papel: 0.5 cm/min  
Ancho del pico (PW): 3  
Muestra: 1 g de té verde en 200 mL  
de fase móvil

### Cromatograma de extracto de té negro



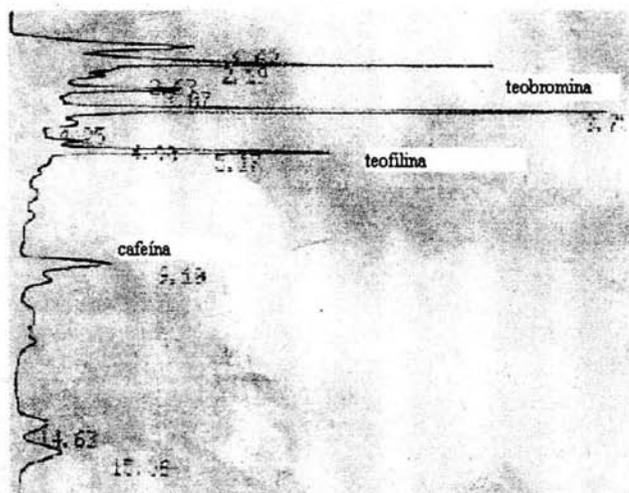
Columna: Waters Spherisorb 5  $\mu$ m ODS2  
4.6 X 150 mm  
Fase móvil: agua/ácido acético/metanol (72:1:27)  
Velocidad de flujo: 1 ml/min  
Atenuación: 128  
Velocidad del papel: 0.5 cm/min  
Ancho del pico (PW): 3  
Alto del pico (PT): 1000  
Muestra: 1 g de té negro en 200 mL de fase Móvil

### Cromatograma de té de hoja de cacao



Columna: Waters Spherisorb 5  $\mu$ m ODS2  
4.6 X 150 mm  
Fase móvil: agua/ácido acético/metanol (72:1:27)  
Velocidad de flujo: 1 ml/min  
Atenuación: 128  
Velocidad del papel: 0.5 cm/min  
Ancho del pico (PW): 3  
Alto del pico (PT): 1000  
Muestra: 2 g de té de hoja de cacao en 100 mL de fase móvil

## Cromatograma de hoja de cacao acidulada



Columna: Waters Spherisorb 5  $\mu$ m ODS2  
4.6 X 150 mm. -  
Fase móvil: agua/ácido acético/metanol (72:1:1)  
Velocidad de flujo: 1 ml/min  
Atenuación: 128  
Velocidad del papel: 0.5 cm/min  
Ancho del pico (PW): 3  
Alto del pico (PT): 1000

Muestra: 2 g de hoja de cacao acidulada en 100 mL de fase móvil

### 8.3 Anexo No. 3 Encuesta de consumo

#### ENCUESTA SOBRE CONSUMO DE TÉ

Favor de contestar las siguientes preguntas o marcar con una cruz (X) cuando sea necesario.

1) Sexo                      Femenino \_\_\_\_\_                      Masculino \_\_\_\_\_

2) Edad \_\_\_\_\_ años

3) ¿Consumes té?              Sí \_\_\_\_\_              No \_\_\_\_\_

**Si tu respuesta es afirmativa, continúa contestando las siguientes preguntas**

4) ¿Con qué frecuencia lo consumes?

- \_\_\_\_\_ diario
- \_\_\_\_\_ cada tercer día
- \_\_\_\_\_ una vez a la semana
- \_\_\_\_\_ una vez al mes
- \_\_\_\_\_ una vez cada tres meses

5) ¿Qué tipo de té consumes? \_\_\_\_\_

6) ¿Dónde lo compras? \_\_\_\_\_

7) ¿Qué presentación compras?

- \_\_\_\_\_ bolsitas
- \_\_\_\_\_ infusión suelta
- \_\_\_\_\_ otra presentación                      ¿Cuál? \_\_\_\_\_

8) ¿Por qué consumes té?

- \_\_\_\_\_ por su sabor
- \_\_\_\_\_ por su poder nutricional
- \_\_\_\_\_ porque te provoca alguna sensación (relajante, digestiva, estimulante)
- \_\_\_\_\_ otra razón                      ¿Cuál? \_\_\_\_\_

9) ¿Cómo consumes el té?

- \_\_\_\_\_ con azúcar
- \_\_\_\_\_ sin azúcar

10) Si existiera en el mercado un té de cacao ¿lo comprarías?    Sí \_\_\_\_\_    No \_\_\_\_\_

## 8.4 Anexo No. 4 Evaluación Sensorial

### Cuestionario de prueba de preferencia

Fecha \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

**INSTRUCCIONES:** Indique su preferencia dando el primer lugar a la muestra que más le guste, el segundo a la siguiente y así sucesivamente. Coloque la clave correspondiente sobre las líneas. No se permiten empates. Favor de enjuagarse con agua después de probar cada muestra. Gracias.

ORDEN	CLAVE
1° (más le gusta)	_____
2°	_____
3°	_____
4° (menos le gusta)	_____

## Cuestionario sobre Nivel de Agrado

Fecha \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

**INSTRUCCIONES:** Pruebe la muestra 126 e indique sobre la escala con una "X" su nivel de agrado para cada una de las características que se le piden. Gracias

### CARACTERISTICA A EVALUAR

COLOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

AROMA

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

SABOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

AGRADO EN GENERAL

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

## Cuestionario sobre Nivel de Agrado

Fecha \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

INSTRUCCIONES: Pruebe la muestra 450 e indique sobre la escala con una "X" su nivel de agrado para cada una de las características que se le piden. Gracias

CARACTERÍSTICA A EVALUAR

COLOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA
-----		

AROMA

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA
-----		

SABOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA
-----		

AGRADO EN GENERAL

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA
-----		

## Cuestionario sobre Nivel de Agrado

Fecha \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

**INSTRUCCIONES:** Pruebe la muestra 721 e indique sobre la escala con una "X" su nivel de agrado para cada una de las características que se le piden. Gracias

**CARACTERISTICA A EVALUAR**

COLOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

AROMA

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

SABOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

AGRADO EN GENERAL

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

## Cuestionario sobre Nivel de Agrado

Fecha \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

**INSTRUCCIONES:** Pruebe la muestra 525 e indique sobre la escala con una "X" su nivel de agrado para cada una de las características que se le piden. Gracias

### CARACTERISTICA A EVALUAR

COLOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

AROMA

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

SABOR

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

AGRADO EN GENERAL

DISGUSTA	INDIFERENTE	GUSTA

## Análisis estadístico de la prueba de evaluación general del Nivel de agrado por los tesde manzanilla, negro, verde y de cacao

Muestras	Cómputo	Promedio	Varianza	Desviación estándar
1 té negro	100	5.202	2.31899	1.52282
2 té manzanilla	100	3.283	1.99941	1.414
3 té verde	100	7.982	0.869774	0.932617
4 té cacao	100	9.462	0.379147	0.61575
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>6.48225</b>	<b>7.14638</b>	<b>2.67327</b>

Muestras	Mínimo	Máximo	Rango
1 té negro	2.4	9.7	7.3
2 té manzanilla	2.0	8.5	6.5
3 té verde	3.2	10.0	6.8
4 té cacao	5.7	10.5	4.8
<b>Total</b>	<b>2.0</b>	<b>10.5</b>	<b>8.5</b>

### ANOVA

#### Análisis de Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma total de cuadrados	F-Ratio	A.Varianza
Entre grupos	2300.24	3	766.747	550.89	0.0000
Intra grupos	551.164	396	1.39183		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>2851.4</b>	<b>399</b>			

### LSD

Método: 95.0 % LSD

Muestras	Cómputo	Significado	Grupos homogéneos
2 té manzanilla	100	3.283	X
1 té negro	100	5.202	X
3 té verde	100	7.982	X
4 té cacao	100	9.462	X

Contraste	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*1.919	0.328009
1 - 3	*-2.78	0.328009
1 - 4	*-4.26	0.328009
2 - 3	*-4.699	0.328009
2 - 4	*-6.179	0.328009
3 - 4	*-1.48	0.328009

- denota diferencia estadística significativa

## Análisis estadístico de la prueba de evaluación del aroma por los tes de manzanilla, negro, verde y de cacao

Muestras	Cómputo	Promedio	Varianza	Desviación estándar
1 té negro	100	4.979	2.30067	1.51679
2 te manzanilla	100	3.096	1.98564	1.40913
3 té verde	100	7.738	0.894905	0.945994
4 té cacao	100	9.035	0.368763	0.607258
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>6.212</b>	<b>6.77249</b>	<b>2.6024</b>

Muestras	Mínimo	Máximo	Rango
1 té negro	2.2	9.7	7.5
2 té manzanilla	2.0	8.0	6.0
3 té verde	3.0	10.0	7.0
4 té cacao	5.0	10.0	5.0
<b>Total</b>	<b>2.0</b>	<b>10.0</b>	<b>8.0</b>

### ANOVA

#### Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma total de cuadrados	F-Ratio	A. Varianza
Entre grupos	2152.77	3	717.592	517.19	0.0000
Intra grupos	549.447	396	1.38749		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>2702.22</b>	<b>399</b>			

### Método: 95.0 % LSD

Muestras	Cómputo	Significado	Grupos homogéneos
2 té manzanilla	100	3.096	X
1 té negro	100	4.979	X
3 té verde	100	7.738	X
4 té cacao	100	9.035	X

Contraste	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*1.883	0.327498
1 - 3	*-2.759	0.327498
1 - 4	*-4.056	0.327498
2 - 3	*-4.642	0.327498
2 - 4	*-5.939	0.327498
3 - 4	*-1.297	0.327498

- denota diferencia estadística significativa

## Análisis estadístico de la prueba de evaluación del sabor por los tes de manzanilla, negro, verde y de cacao

Muestras	Cómputo	Promedio	Varianza	Desviación estándar
1 té negro	100	5.055	2.28694	1.51226
2 té manzanilla	100	3.15	2.00939	1.41753
3 té verde	100	7.819	0.878726	0.937404
4 té cacao	100	9.281	0.379736	0.616228
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>6.32625</b>	<b>7.05833</b>	<b>2.65675</b>

Muestras	Mínimo	Máximo	Rango
1 té negro	2.2	9.7	7.5
2 té manzanilla	2.0	8.3	6.3
3 té verde	3.0	10.0	7.0
4 té cacao	5.2	10.0	4.8
<b>Total</b>	<b>2.0</b>	<b>10.0</b>	<b>8.0</b>

### ANOVA

#### Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma total de cuadrados	F-Ratio	A. Varianza
Entre grupos	2266.35	3	755.45	544.00	0.0000
Intra grupos	549.925	396	1.3887		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>2816.27</b>	<b>399</b>			

### Método: 95.0 % LSD

Muestras	Cómputo	Significado	Grupos homogéneos
2 té manzanilla	100	3.15	X
1 té negro	100	5.055	X
3 té verde	100	7.819	X
4 té cacao	100	9.281	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*1.905	0.32764
1 - 3	*-2.764	0.32764
1 - 4	*-4.226	0.32764
2 - 3	*-4.669	0.32764
2 - 4	*-6.131	0.32764
3 - 4	*-1.462	0.32764

\* denota diferencia estadística significativa

## Análisis estadístico de la prueba de evaluación del color por los tes de manzanilla, negro, verde y de cacao

Muestras	Cómputo	Promedio	Varianza	Desviación estándar
1 té negro	100	5.274	2.33043	1.52657
2 té manzanilla	100	3.354	1.99463	1.41231
3 té verde	100	8.067	0.851122	0.922563
4 té cacao	100	9.49	0.355657	0.596369
<b>Total</b>	<b>400</b>	<b>6.54625</b>	<b>7.0837</b>	<b>2.66152</b>

Muestras	Mínimo	Máximo	Rango
1 té negro	2.4	9.8	7.4
2 té manzanilla	2.0	8.4	6.4
3 té verde	3.2	10.0	6.8
4 té cacao	5.7	10.0	4.3
<b>Total</b>	<b>2.0</b>	<b>10.0</b>	<b>8.0</b>

### ANOVA

#### Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma total de cuadrados	F-Ratio	A. Varianza
Entre grupos	2278.74	3	759.581	549.24	0.0000
Intra grupos	547.652	396	1.38296		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>2826.39</b>	<b>399</b>			

### LSD

Método: 95.0 % LSD

Muestras	Cómputo	Significado	Grupos homogéneos
2 té manzanilla	100	3.354	X
1 té negro	100	5.274	X
3 té verde	100	8.067	X
4 té cacao	100	9.49	X

Contraste	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*1.92	0.326963
1 - 3	*-2.793	0.326963
1 - 4	*-4.216	0.326963
2 - 3	*-4.713	0.326963
2 - 4	*-6.136	0.326963
3 - 4	*-1.423	0.326963

- denota diferencia estadística significativa

Tabla de Nivel de Significancia al 5 %

Diferencia de sumatoria ordinal absoluta crítica de "todos los tratamientos"  
comparaciones al nivel de significancia del 5%.

Nuestras	Número de muestras									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	6	8	11	13	15	18	20	23	25	28
4	7	10	13	15	18	21	24	27	30	33
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	39	43	47
9	10	15	19	23	27	32	35	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	26	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	66
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	58	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	66	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	68	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	63	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	86	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	55	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	88	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111

*Continuación*

<i>Jueces</i>	<i>Número de muestras</i>								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103
47	23	33	42	52	62	72	83	93	104
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106
50	24	34	44	54	64	75	85	95	107
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144
95	33	46	60	74	88	103	118	133	148
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151

### Tabla de Nivel de Significancia al 1 %

Diferencia de sumatoria ordinal absoluta crítica de "todos los tratamientos"  
Comparaciones al nivel de significancia del 1%.

<i>Jueces</i>	<i>Número de muestras</i>									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	—	9	12	14	17	19	22	24	27	30
4	8	11	14	17	20	23	26	29	32	36
5	9	13	16	19	23	26	30	33	37	41
6	10	14	18	21	25	29	33	37	41	45
7	11	15	19	23	28	32	36	40	45	49
8	12	16	21	25	30	34	39	43	48	53
9	13	17	22	27	32	36	41	46	51	56
10	13	18	23	28	33	38	44	49	54	59
11	14	19	24	30	35	40	46	51	57	63
12	15	20	26	31	37	42	48	54	60	66
13	15	21	27	32	38	44	50	56	62	68
14	16	22	28	34	40	46	52	58	65	71
15	16	22	28	35	41	48	54	60	67	74
16	17	23	30	36	43	49	56	63	70	77
17	17	24	31	37	44	51	58	65	72	79
18	18	25	31	38	45	52	60	67	74	81
19	18	25	32	39	46	54	61	69	76	84
20	19	26	33	40	48	55	63	70	78	86
21	19	27	34	41	49	56	64	72	80	88
22	20	27	35	42	50	58	66	74	82	90
23	20	28	35	43	51	59	67	75	84	92
24	21	28	36	44	52	60	69	77	85	94
25	21	29	37	45	53	62	70	79	87	96
26	22	29	38	46	54	63	71	80	89	98
27	22	30	38	47	55	64	73	82	91	100
28	22	31	39	48	56	65	74	83	92	101
29	23	31	40	48	57	66	75	85	94	103
30	23	32	40	49	58	67	77	86	95	105
31	23	32	41	50	59	69	78	87	97	107
32	24	33	42	51	60	70	79	89	99	108
33	24	33	42	52	61	71	80	90	100	110
34	25	34	43	52	62	72	82	92	102	112
35	25	34	44	53	63	73	83	93	103	113
36	25	35	44	54	64	74	84	94	105	115
37	26	35	45	55	65	75	85	95	106	117
38	26	36	45	55	66	76	86	97	107	118
39	26	36	46	56	66	77	87	98	109	120
40	27	36	47	57	67	78	88	99	110	121
41	27	37	47	57	68	79	90	100	112	123
42	27	37	48	58	69	80	91	102	113	124
43	28	38	48	59	70	81	92	103	114	126
44	28	38	49	60	70	82	93	104	115	127
45	28	39	49	60	71	82	94	105	117	128

*Continuación*

<i>Jueces</i>	<i>Número de muestras</i>									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
46	28	39	50	61	72	83	95	106	118	130
47	29	39	50	62	73	84	96	108	119	131
48	29	40	51	62	74	85	97	109	121	133
49	29	40	51	63	74	86	98	110	122	134
50	30	41	52	63	75	87	99	111	123	135
65	34	46	59	72	86	99	113	126	140	154
70	35	48	61	75	89	103	117	131	146	160
75	36	50	64	78	92	106	121	136	151	166
80	37	51	66	80	95	110	125	140	156	171
85	38	53	68	83	98	113	129	144	160	176
90	40	54	70	85	101	116	132	149	165	181
95	41	56	71	87	103	120	136	153	169	186
100	42	57	73	89	106	123	140	157	174	191