



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO ANALÍTICO DE LA CALIDAD DE CACAO CON  
BASE EN SUS PROPIEDADES QUÍMICO ANALÍTICAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**ANGEL DE JESÚS ALVAREZ ROMERO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2021**



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:** Profesor: REYES SALAS EUGENIO OCTAVIO  
**VOCAL:** Profesor: HERNANDEZ GARCIADIEGO LUCIA  
**SECRETARIO:** Profesor: GARCIA IÑARRITU ANA ELENA  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: CAMACHO FRIAS EVANGELINA  
**2° SUPLENTE:** Profesor: ZELADA GUILLEN GUSTAVO ADOLFO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DEPG.  
LABORATORIO 114, SOTANO DEL EDIFICIO B  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

GERARDO REYES GARCÍA

**SUSTENTANTE:**

---

ANGEL DE JESÚS ALVAREZ ROMERO

Contenido	Página
1.-Introducción	1
1.1.- Importancia histórica del cacao	1
1.2.- Importancia de la composición del cacao	1
2.-Antecedentes	4
2.1.- Cacao y su historia	4
2.2.- Cacao y su situación actual	7
2.3.- Morfología y procesamiento	10
2.4.- Estudios previos realizados a los analitos de interés del presente trabajo	12
2.5.- Teobromina	13
2.6.- Cafeína	13
2.7.- Efectos de la cafeína y la teobromina	14
2.8.- Métodos de determinación existentes para los alcaloides de interés.	15
2.8.1- Teobromina.	15
2.8.2- Cafeína.	16
2.9.- Fundamentos de electroquímica	18
2.9.1.- La polarografía	18
2.9.2.- El polarograma	19
2.9.3.- Aplicaciones de la polarografía en análisis cualitativo y cuantitativo.	20
2.9.4.- Estudio matemático de las ondas polarográficas	21
2.9.5.- Polarografía diferencial de impulsos	24
3.- Objetivos	26
3.1.- Objetivo general	26
3.2.- Objetivos particulares	26
4.- Metodología	27
4.1.- Reactivos	27
4.2.- Disoluciones	27
4.3.- Equipo	28

4.4.- Muestra analizada	28
4.5.- Experimentación	29
5.- Resultados y análisis	45
5.1.- Análisis fundamental para la determinación de teobromina y cafeína	45
5.2.- Estudio electroquímico fundamental de la teobromina y la cafeína	46
5.2.1- Teobromina	46
5.2.2- Cafeína	50
5.3.- Determinación del % de teobromina y cafeína extraídos mediante extracciones sucesivas con cloroformo	53
5.3.1.- Constante de reparto de la teobromina en cloroformo	54
5.3.2.- Constante de reparto de la cafeína en cloroformo	57
5.4.- Determinación de teobromina y cafeína en un extracto natural procedente de granos de cacao de la región de Tabasco.	61
5.5.- Determinación de azúcares reductores y sacarosa invertida en un extracto natural procedente de granos de cacao de la región de Tabasco.	67
5.6.- Análisis fundamental para la determinación de cationes	70
5.7.- Determinación de cationes en un extracto natural procedente de granos de cacao de la región de Tabasco.	74
6.- Conclusiones	77
7.- Perspectivas a futuro	79
8.- Bibliografía	80
9.- Anexos	86

9.1.- Análisis logarítmico	86
9.1.1.- Análisis logarítmico de la teobromina	86
9.1.2.- Análisis logarítmico de la cafeína	87
9.2.- Determinación del límite de detección y límite de cuantificación para la teobromina y cafeína.	88
9.2.1.- Teobromina.	88
9.2.2.- Cafeína.	92
9.3.- Cálculo del % de humedad en la muestra.	93
9.4.- Preparación de las disoluciones de Fehling y valoración de la disolución A de Fehling por polarografía.	94
9.5.- Determinación del límite de detección y límite de cuantificación del Cu(II), Zn(II), Cd(II) y Pb(II).	96
9.6.- Cálculo del % de Zinc en la muestra.	99
9.7.- Lavado del mercurio utilizado y cuidado del electrodo goteante de mercurio.	102

# 1 Introducción

## 1.1.- Importancia histórica del cacao

El nombre científico del árbol de cacao se atribuye al botánico sueco Carl Von Linné al denominar *Theobroma cacao* al árbol del que provienen las semillas del cacao. El nombre resulta de mezclar las palabras del griego θεός /teos/ dios + βρώμα /broma/ alimento *Theobroma* que en griego significa “alimento de los dioses” y *cacao* que era el vocablo en lengua náhuatl usado en toda Mesoamérica para denominar a la semilla y la bebida que la tenía como base <sup>[1]</sup>.

Para la sociedad en general, el cacao fue un elemento de gran importancia, el cual fue introducido al altiplano central durante el periodo posclásico por los Pochtecas como tributo sumado a su uso como equivalencia en el intercambio comercial; el comercio del cacao generó la apertura de nuevas rutas comerciales para su distribución que conllevó intercambios culturales, además de fortalecer las relaciones económicas y políticas entre las diversas civilizaciones mesoamericanas. Los Nahuas utilizaron las representaciones pictóricas para especificar las cualidades curativas o alimenticias de las plantas que consumían, entre las cuales se encontraba el cacao el cual también destacó en el ámbito religioso, tanto para los mayas como para los Nahuas, al ser utilizado en diversas fiestas, para consumo y en las ofrendas. Las semillas de cacao, una vez tostadas y molidas servían para preparar bebidas acompañadas por diferentes ingredientes como eran el chile, miel, maíz, flores, achiote, etc., estas bebidas eran las predilectas de los estratos sociales más altos (*Tlatoani*, nobles y guerreros).

## 1.2.- Importancia de la composición del cacao

El consumo moderado de chocolate brinda beneficios a la salud ya que posee compuestos como teobromina, cafeína, azúcares reductores, polifenoles y otros que poseen propiedades antioxidantes, las cuales previenen el estrés oxidativo en las células y la formación de peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados, también contienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, efectos sobre el sistema cardiovascular, incremento de la secreción de ácidos gástricos y estimulación del

sistema nervioso <sup>[2]</sup>, lo que promueve una mejor concentración y procesamiento de información, así como también reducción en la fatiga mental. Sin embargo, el consumo en grandes cantidades puede causar agitación, irritabilidad, escalofríos, temblores, mareos, taquicardia e hipertensión <sup>[3]</sup>.

Hoy en día la nutrición se orienta a proporcionar alimentos que además de los nutrientes, contienen otros compuestos biológicamente activos que aportan un beneficio adicional y que contribuyen a reducir el riesgo de sufrir enfermedades <sup>[4]</sup>, por lo cual la determinación de los principales componentes del cacao entre ellos compuestos bioactivos como la teobromina y cafeína, es muy importante, dados los efectos que tienen sobre el consumidor, sumado a que la determinación de estos componentes permitirán optimizar los procesos principales a los que es sometido el cacao, como su cultivo, secado y fermentado que influyen en su composición y calidad, lo cual se ve reflejado en su precio y en la calidad de los productos elaborados a partir del grano de cacao. Además, al obtener la composición real del grano, se podrán asociar parámetros de identificación geográfica y de su variedad, lo cual se ha vuelto un aspecto importante para el consumidor <sup>[5]</sup>. Con el presente trabajo se busca generar las bases para la determinación de estos componentes mediante estudios analíticos, de forma que en posteriores trabajos se puedan llegar a establecer metodologías o protocolos que permitan a los pequeños y medianos productores tener noción de la calidad de su producto.

A pesar de que en la normatividad existente <sup>[6,7,8,9,10,11,12,13]</sup> se consideran aspectos químicos de calidad, los más desarrollados son los análisis organolépticos, por lo cual existe una apertura para el desarrollo de nuevos estudios analíticos de la composición del cacao.

Hemos de tener en cuenta que el cacao es un producto natural, por lo cual su composición no es exacta y constante. Si se considera por un lado el análisis sensorial del cacao, se ve que ha alcanzado un alto grado de desarrollo pero mantiene su carácter subjetivo; por otro lado, la determinación analítica de algunos de los componentes principales del cacao se ha realizado por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) <sup>[14]</sup>. Sin embargo, aunque HPLC es un método



muy bueno, también es más costoso y laborioso que los métodos electroquímicos por lo cual no todos los pequeños y medianos productores pueden tener acceso a estudios de calidad, mientras que al disponer de estudios electroquímicos, más productores podrán conocer la calidad real de su producto.

Los estudios realizados en los últimos años indican, aunque con un amplio intervalo de variación, una composición general del cacao:

1.- Compuestos solubles en agua: Principalmente teobromina, cafeína, azúcares reductores, di y polisacáridos, algunos minerales, proteínas y compuestos volátiles orgánicos responsables de aromas y sabores.

2.- Compuestos no solubles en agua: Principalmente lípidos, proteínas y fibra.

Como actualmente se han identificado cientos de sustancias en estos productos naturales, en este proyecto se propone un trabajo sistemático que busque con economía de fuerzas y recursos, conocer la calidad relativa del cacao

Para este fin se plantea un estudio químico analítico para determinar el contenido de los principales componentes en cacao:

1.- Teobromina y cafeína: Determinación por electroquímica.

2.- Azúcares reductores: Determinación potenciométrica.

3.- Sacarosa: Determinación potenciométrica.

4.- Cationes de metales pesados: Determinación electroquímica.

## 2 Antecedentes

### 2.1.- Cacao y su historia

Existen varias teorías respecto al origen del cacao, en una de ellas se plantea que el cacao se originó en la Alta Amazonia hace unos 10,000 a 15,000 años; en otra se plantea que pudo proceder de una especie silvestre de la región norte de Colombia y Venezuela debido al hallazgo de un gran número de otras especies con genes de cacao. En este aspecto, se señala que si bien las poblaciones de América del Sur tenían conocimiento del cacao, ellas se limitaban a consumir la pulpa del cacao y elaborar una bebida fermentada con ella, por lo cual se situaría a los Mayas como los primeros en cultivar, procesar y consumir las semillas de *Theobroma cacao*. También los mayas tenían una simbología especial para representar al cacao, el cual consistía de un símbolo parecido a un pez y otro parecido a un peine, ambos signos eran representación de la sílaba Ka, por lo tanto para representar al cacao, “se combinaban las sílabas ka-ka-w(a), por convención, la última vocal no se pronunciaba en las palabras que terminaban en consonante”.

Se considera que en el desarrollo del comercio del cacao se pueden distinguir dos etapas, en un inicio el cacao fue utilizado como trueque y en una segunda etapa se le dio un valor determinado de forma que funcionara como equivalencia en el mercado, lo cual también sucedió con algunos productos importantes o valiosos. El comercio del cacao estaba a cargo de dos tipos de comerciantes, los pequeños que vendían sus productos en mercados locales y los grandes comerciantes (Pochtecas), los cuales tenían una posición privilegiada en la sociedad, transportaban los productos largas distancias (cientos de kilómetros), vendían al mayoreo y eran dueños de flotas de canoas y esclavos <sup>[1]</sup>.

Debido a la importancia del cacao y de los Pochtecas, se generaron guerras y alianzas con el fin de tener control de rutas comerciales y tributos, como resultado de esta campaña militar, los mexicas conquistaron el Soconusco, de esta región del litoral Chiapaneco eran embarcadas grandes cantidades de cacao hacia el Valle de México; otra región importante productora de cacao fue la actual Veracruz, que

también mandaba cacao como tributo. Además del cacao, algunos artículos que se pedían como tributo abarcaban oro, plumas y caracoles.

En datos registrados en el Códice Mendocino, el tributo total de las regiones proveedoras de cacao al imperio mexica (Cihuatlan, Xoconochco, Cuauhtochco, Cuetlaxtlan, Tlatelolco y Tochtepec), era equivalente a 940 cargas de cacao al año (1 carga de cacao equivalía a 24,000 granos de cacao) y “el cacao se tributaba en sus diferentes estados, es decir, como grano entero, como grano molido, en polvo y cacao mezclado con otros ingredientes” [1].

En el Altiplano Central, se organizaron los *tianquiztli*, en los cuales se daba la compra y venta de productos; un grupo de jueces establecía el orden y el precio de las mercancías. En este punto el cacao ya se utilizaba como equivalencia en el intercambio comercial, entre los mexicas, mayas, nicaraos y los habitantes de Panamá, “la apreciación del cacao como unidad monetaria en el intercambio de productos radicaba en la escasez y en la remota localización o distante lugar de producción”. Con las campañas militares de la Triple Alianza y su imposición de tributo a las regiones productoras de cacao, se intensificó el consumo y la posesión del cacao entre los grupos sociales dominantes [1].

El hombre común (*macehualtin*) no tenía acceso a este producto, por una parte debido a su alto valor como producto de consumo y por otra parte debido a las ideas elitistas de los grupos privilegiados, los *macehualtin* solamente podían tomar el cacao con fines medicinales en forma de *xocoatl*; antes de tomarse cualquier bebida a base de cacao, ésta debía producir espuma, para lo cual se vertía de un recipiente a otro desde cierta altura, esto con el fin de tomar solo la parte ligera.

En la poesía náhuatl aparece la recurrencia de un universo de símbolos, se mencionan lugares y colores que denotan los rumbos del universo, los poetas (*cuicapicque*) crearon una poesía rica de significaciones; el cacao fue un elemento de gran simbolismo en el pensamiento filosófico; las composiciones expresan la felicidad, alegría y la alta estima que se le atribuía a esta planta.

También, se aprecia que los mesoamericanos concibieron una analogía entre sangre y cacao, refiriéndose a éste como símbolo de poder y acceso a ciertos recursos de las clases privilegiadas; “la prerrogativa de consumir cacao en algunos casos se extendía entre otros grupos sociales como el de los *macehualtin*, quienes por sus hazañas guerreras ascendían de categoría y de este modo obtenían el derecho de beber pulque, cacao, y a oler flores perfumadas; así, la utilización de cacao simbolizó la prosperidad y buenos augurios” [1].

Después de la conquista, el cacao siguió cumpliendo el rol de moneda hasta el siglo XIX debido a la escasez de la moneda metálica que comenzó a circular en la Nueva España en el siglo XVI.

Se describe que “el primer registro de cacao en Europa es de 1544, cuando unos dominicos presentaron a un grupo de indígenas mayas ante el príncipe Felipe de España y al mismo tiempo le llevaron algunos regalos entre los que se encontraban unos recipientes con alguna bebida de cacao”, por lo cual los primeros europeos en apreciar el sabor y ser consumidores habituales de las bebidas de cacao debieron ser los religiosos, quienes en los constantes viajes realizados entre España y Nueva España llevaban cacao a Europa y lo consumían durante el viaje, llegando incluso a consumirlo durante la misa, hecho que después repercutiría en una larga discusión eclesiástica sobre si el cacao rompía el ayuno o no, de forma que se prohibiera o no su consumo durante las celebraciones religiosas y en tiempos de ayuno como la cuaresma. En cuanto a la difusión del cacao en el viejo continente, fueron los jesuitas los responsables de este fenómeno [15].

En el siglo XVI, se comenzó a importar cacao procedente de Venezuela y Guayaquil debido a la alta demanda de cacao por parte de la Nueva España, sumado al hecho de una baja de productividad local causada por la muerte de los indígenas por efecto de enfermedades y explotación.

En el siglo XVI, el cacao llegó más allá de España, empezando por Italia y Francia; no se sabe las razones con certeza, pero pudo deberse ya sea por importación de alguna persona relacionada con la realeza o debido a los atributos medicinales que se le atribuían al cacao. Con respecto a estos atributos, los pobladores

mesoamericanos sabían del uso del cacao para ayudar en el tratamiento de malestares y enfermedades; por su parte, Bernardino de Sahagún prohibió el uso del cacao para ciertos tipos de malestares y dolores y lo prescribió para otros; sin embargo, fue hasta tiempo después que se empezó a investigar más los efectos curativos del cacao. También se describe que en la época en que el cacao llegó a España, la teoría médica predominante era la galena, donde se atribuía una característica a la enfermedad y se combatía con el tipo contrario; así, en 1624 fue publicado en España “*Un Discurso del Chocolate*” por el médico y profesor Santiago Valverde Turices, en el que expone la naturaleza fría adjudicada al cacao. Explicada sobre las bases de la teoría galénica, se argumentaba que era eficaz contra enfermedades de origen caliente; también nos da otro ejemplo, del doctor Antonio Colmenero de Ledesma, quien en 1631 escribió un libro llamado “*Tratado sobre la naturaleza y cualidad del chocolate*” en el cual el médico trata al chocolate como un elemento compuesto, ya que aparte de la cualidades de frialdad y sequedad también tenía cualidades de humedad y calor provenientes de la grasa de cacao. Algunos médicos incluso le atribuían propiedades afrodisiacas [15].

Después de Italia y Francia, el cacao llegó a Inglaterra en 1650, esta vez debido a la actividad de los piratas que surcaban las aguas del Caribe y de Nueva España; rápidamente fue aceptado por la corte y al final llegó a las cafeterías inglesas, las cuales fueron los primeros establecimientos en donde se vendió el chocolate a precios económicos, así como el café y el té [15].

## **2.2.- Cacao y su situación actual.**

El cultivo de cacao forma parte de la historia del continente americano, desde la época precolombina hasta el presente; es su centro de origen y de domesticación. El cacao es un cultivo de plantación tropical establecido en regiones cálidas y húmedas en latitudes comprendidas entre los 10° norte y 10° sur del Ecuador, produce granos o almendras que son materia prima para la elaboración de chocolates y grasas para las industrias alimentarias y cosmetológicas en más de 50 países ubicados en África, América y Oceanía. El continente africano es

responsable del 73% de la producción, los países de América contribuyen con el 17% de la producción mundial, Asia y Oceanía aportan el 10% de la producción [16].



Figura 1. - Planta del cacao.



Figura 2.- Almendra de cacao.

En localidades específicas de Chiapas, Oaxaca, Guerrero y Tabasco en México, se concentra casi la totalidad de producción de cacao del país, la *cacaocultura* es una importante base para el desarrollo de los territorios rurales en los que se localiza y es un pilar esencial para el impulso de un modelo de desarrollo empresarial incluyente en la medida en que se convierte en una estructura que genera riqueza en la base de la pirámide y vínculos de complementariedad con la gran empresa regional, nacional e internacional [16].

El cacao y todos sus derivados son comercializados en todo el planeta y su mercado se diversifica y se hace exigente en volumen y calidad permanente.

El cacao en grano representa un 27% del total de las exportaciones de productos derivados de este cultivo, la manteca representa el 8%, la pasta o el licor el 7%, la torta y el polvo el 9% y el chocolate el 49%.



Figura 3.- Cultivo del cacao.



Figura 4.- Derivados del cacao.

En la manufactura del chocolate es importante que antes de procesarse se revise la calidad de los granos, como su grado de fermentación, humedad, granos que se encuentren fracturados, si existe presencia de hongos, el perfil aromático, color, contenido de grasa, calidad de la grasa, cascarilla, uniformidad en tamaño y si hay indicios de presencia de roedores o insectos.

Los mercados maduros cada día exigen más atributos y establecen mayores condiciones vinculadas a la inocuidad (nuevos límites máximos sobre residuos de pesticidas, micotoxinas, hidrocarburos aromáticos, metales pesados como el cadmio, etc.), los mercados emergentes exigen más cantidad (volumen) y menores precios, pero estos últimos paulatinamente van homologando sus exigencias de calidad con las de los mercados maduros; los mercados de los productos finales (especialmente el chocolate) se van especializando cada vez más y las exigencias sobre la calidad sensorial y sobre los efectos en la salud de los consumidores cada día juegan un papel de mayor peso en dicha especialización. Se buscan chocolates con menos contenidos de grasa y azúcar, pero con sabores y aromas más intensos y complejos, con denominaciones de origen y trazabilidad.

Estas son las tendencias de consumo que dominarán importantes nichos de mercado en los próximos años.

### 2.3.- Morfología y procesamiento

La planta de cacao fue clasificada desde la antigüedad como una planta de la familia de las malváceas; sin embargo, estudios más actuales la sitúan en la familia de las esterculiáceas, las cuales se definen usando el *Diccionario enciclopédico básico* como: “Plantas dicotiledóneas, cuyas especies son barbáceas o leñosas, las cuales tienen flores de estambres soldados y fruto generalmente en cápsula y con varias semillas” [1].

Son diferentes los tipos de cacao producidos en el mundo, eso ha dado origen a una clasificación tradicional que aún persiste.

Existen básicamente tres variedades de cacao a partir de las cuales se desprenden los híbridos y clones que hoy se siembran en el mundo: los Criollos, Forasteros y Trinitarios, este último es un híbrido del Criollo y del Forastero.

Los árboles de cacao Criollo son relativamente raros y menos robustos comparados con otras variedades, la corona del árbol Criollo es redonda y sus hojas verde pálido son pequeñas y ovaladas, los granos de cacao son blanco marfil, el cacao Criollo es caracterizado por mazorcas alargadas, que son verdes y rojas cuando el grano está inmaduro y conforme se maduran se tornan amarillas y rojo-naranja, los granos de cacao del árbol Criollo son deseables debido a su sabor almendrado y afrutado, los granos Criollos requieren entre 2 y 3 días de fermentado y son muy aromáticos, basados en estas cualidades, los granos Criollos tienen la designación comercial de “cacao fino” [17].

Por su parte los árboles de cacao Forasteros o Amazónicos, tienen estambres violetas con mazorcas que se tornan violetas durante la maduración, las mazorcas son estriadas y ligeramente ásperas, con puntas suaves y redondeadas, la cáscara de los granos de cacao Forastero son gruesas con un mesocarpio lignificado y los granos en sí son aplanados con cotiledones púrpuras, los granos Forasteros requieren entre 5 y 7 días de fermentado; a su vez el chocolate elaborado con cacao Forastero tiene un sabor básico.



Finalmente el cacao Trinitario es un híbrido polimórfico que porta intermediarios Criollos y una variedad Forastero que tiene una disyunción relevante en los descendientes Trinitarios, el cacao trinitario tiene una calidad intermedia <sup>[17]</sup>; hoy su cultivo está ampliamente extendido en América (entre los países se encuentra México) y en algunos países de África; representa alrededor del 15% de la producción mundial, sus granos bien procesados junto a los provenientes de cacaos criollos son reconocidos en el mercado por su calidad <sup>[16]</sup>.

Los granos de cacao consisten en 2 cotiledones (la punta de cacao) y un pequeño embrión de planta, todo encapsulado en una piel (cáscara); los cotiledones almacenan los nutrientes para la germinación de la semilla y se convierten en las primeras dos hojas de la planta cuando la semilla germina. El almacén de nutrientes consiste en grasa, llamada manteca de cacao, que representa alrededor de la mitad del peso de la semilla seca; la cantidad de grasa y sus propiedades como el punto de fusión y su dureza dependen de la variedad de cacao y las condiciones ambientales <sup>[18]</sup>.

Las semillas se fermentan, lo cual causa varios cambios químicos en la pulpa que rodea a las semillas y dentro de las semillas, primeramente se realiza una fermentación alcohólica en ausencia de oxígeno (anaerobia), en esta etapa predominan levaduras y bacterias lácticas las cuales generan metabolitos como etanol y ácidos orgánicos, la temperatura aumenta hasta los 40°C y se produce la muerte del embrión y la degradación del mucílago que recubre la semilla de cacao, debido a enzimas pectolíticas de las levaduras, después se tiene una fermentación con presencia de oxígeno (aerobia) en la cual el etanol es convertido a ácido acético debido a la acción de bacterias del género *Acetobacter spp.*, estos cambios causan el desarrollo del sabor del chocolate y el cambio de color de las semillas, después las semillas se secan con lo cual se elimina el ácido acético además se producen reacciones de Maillard entre azúcares reductores y aminoácidos producidos durante la fermentación <sup>[2,4,19]</sup>, después las semillas se llevan a los procesadores de materia prima, para la obtención de los productos como polvo de cacao, manteca de cacao y pasta de cacao; lo primero es tostar los granos de cacao, para cambiar el color y

el sabor, después se remueve la cáscara. El licor de cacao se obtiene al moler la “punta de cacao”. La manteca de cacao se puede extraer del grano de cacao de varias formas; mediante presión de la masa de cacao por medio de prensas horizontales se obtiene una manteca pura, ésta no necesita limpieza, pero usualmente se le retira el olor; también se puede extraer la manteca mediante un proceso de extracción con solventes, pero esta manteca debe ser refinada. La manteca pura presenta un punto de fusión de 35°C, con ablandamiento a 30-32 °C y con fractura por fragilidad a una temperatura menor a los 20°C. El polvo de cacao resulta de aplastar los restos del licor de cacao una vez extraída la manteca de cacao mediante las prensas <sup>[18]</sup>.

#### **2.4.- Estudios previos realizados a los analitos de interés del presente trabajo.**

En cuanto a la determinación de cationes, un estudio previo, nos ilustra respecto a la viabilidad de su determinación por medio de electroquímica; aunque en una matriz diferente, se lograron determinar algunos de los metales pesados de interés para el presente estudio en una matriz de fosfatos, obteniendo buenos límites de detección y límites de cuantificación <sup>[20]</sup>.

En el caso de la determinación de azúcares reductores y sacarosa invertida, también se ha avanzado en este ámbito; en un estudio previo se muestra la determinación de azúcares reductores y sacarosa invertida mediante potenciometría, en miel <sup>[21,22]</sup>, lo que nos da la pauta para la utilización de esta técnica en nuestra matriz problema (semillas de cacao).

En el caso de la determinación electroquímica de cafeína y teobromina, se puede observar para el caso de la cafeína que se han realizado estudios de forma que se pueda aplicar a análisis de muestras como es el caso de muestras de café. Uno de estos estudios muestra una forma de determinar el contenido de cafeína en café mediante el uso de la voltamperometría diferencial de impulsos utilizando un electrodo de carbono vítreo modificado en el que se observa una señal de oxidación del analito <sup>[23]</sup>; la investigación nos da la pauta para la determinación de la cafeína en otra matriz, sumado al hecho de que se podría utilizar un electrodo diferente para realizar el análisis. Esta información indica que es posible la determinación

electroquímica de la cafeína y, como la teobromina tiene una gran similitud estructural con la cafeína, es posible que también pueda ser determinada por electroquímica.

## 2.5.- Teobromina.

La teobromina, cuyo nombre oficial en la IUPAC es: 3,7-Dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona; 3,7-dimetilxantina, con fórmula condensada  $C_7H_8N_4O_2$  y cuyo peso molecular es de 180.17 g/mol, es un alcaloide de la familia de las metilxantinas. Es un polvo cristalino, de color blanco e inodoro, con un punto de fusión de 357 °C y que sublima a 290-295 °C, poco soluble en agua (0.5 g/L de agua) y prácticamente insoluble en benceno, éter y cloroformo [24,25]. Es el principal alcaloide del grano de cacao, que contiene 0.8 – 1.3 % de teobromina [26,27].

A.Woskresensky descubrió la teobromina en granos de cacao en 1841 y E. Fischer la sintetizó en 1882 [28].

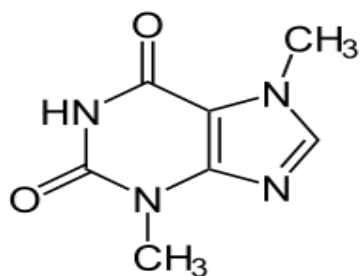


Figura 5.- Molécula de teobromina.  
(*The Merk Index*, CAS Number: 83-67-0)



Figura 6.- Aspecto físico de la teobromina.

## 2.6.- Cafeína

La cafeína, cuyo nombre oficial en la IUPAC es: 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona; 1,3,7-trimetilxantina; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina, con fórmula condensada  $C_8H_{10}N_4O_2$  y cuyo peso molecular es de 194.19 g/mol, es un alcaloide de la familia de las metilxantinas, es un polvo de color blanco e inodoro, con un punto de fusión de 328°C y sublima a 178°C, soluble en agua (22 g/L), también soluble en alcohol, acetona, en éter, benceno y en cloroformo (181 g/L de

cloroformo) [24,29]. Es el alcaloide secundario del grano de cacao, que contiene 0.1–0.7% de cafeína [26,27].

Friedlieb Ferdinand Runge, descubrió la cafeína en 1819 [30].

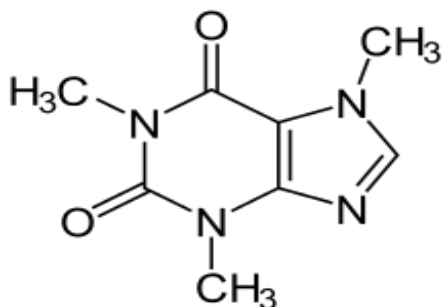


Figura 7.- Molécula de cafeína.  
(*The Merk Index, CAS Number: 58-08-2*)



Figura 8.- Aspecto físico de la cafeína.

## 2.7.- Efectos de la cafeína y la teobromina

Las acciones benéficas de la cafeína y la teobromina van desde mayor estado de alerta, hasta reducción del riesgo de enfermedades neurodegenerativas [31].

La combinación de cafeína y teobromina en cacao puede tener los beneficios esperados de la metilxantina sin los efectos secundarios reportados para la cafeína. El mecanismo de acción principal de la cafeína y teobromina consiste en bloquear los receptores de adenosina e inhibir fosfodiesterasas [31].

Es importante notar que ni la cafeína ni la teobromina son sustancias adictivas; los principales efectos farmacológicos de la cafeína, debido a su similitud estructural con la molécula de adenosina incluyen la inhibición de fosfodiesterasas (enzimas que degradan el segundo mensajero, adenosin monofosfato cíclico (cAMP)), la regulación del nivel de calcio intracelular y el antagonismo de receptores de adenosina. Además puede generar otros procesos periféricos como relajación de músculos blandos o la estimulación de la diuresis y contracción del músculo cardíaco. La cafeína es principalmente metabolizada por el hígado y uno de sus metabolitos es la teobromina.

Como metilxantinas, la cafeína y la teobromina son bloqueadores de los receptores de adenosina; la adenosina es un metabolito intermedio y también una molécula mensajera, que ejerce su acción como hormona en la periferia y actúa como un potente neuroregulador en el sistema nervioso central.

La vida media de la teobromina es mayor que la de la cafeína; la importancia de este factor es evidenciado cuando las metilxantinas son usadas como broncodilatadores en el tratamiento de pacientes asmáticos.

La teobromina es útil en el tratamiento del asma y en otros problemas del tracto respiratorio, como la tos, para la cual no se ha desarrollado un medicamento definitivo.

En algunos estudios, la teobromina parece suprimir la tos inhibiendo la activación de nervios aferentes. Un reporte mostró que la difusión de la teobromina en la subestructura de los pulmones es mayor que la de otros medicamentos usados en la terapia de enfermedades respiratorias.

## **2.8- Métodos de determinación existentes para los alcaloides de interés**

### **2.8.1- Teobromina.**

Por medio de diferentes técnicas analíticas, se ha logrado la determinación de la teobromina, como es el caso de la cromatografía líquida de alto rendimiento; Lo Coco et al reportan el uso de HPLC de fase reversa acoplada a un detector UV, los componentes fueron separados usando una columna Supelcosil LC-18 (250x4.6 mm, 5 µm, Supelco, Sigma-Aldrich, Milan, Italia) y una precolumna Supelguard LC-18 (20x2.1 mm, Supelco), los análisis se llevaron a cabo utilizando una elución isocrática a temperatura ambiente con una fase móvil de metanol-agua-ácido acético (80:19:1), a una velocidad de elución de 1 mL/min y una absorbancia de detección UV de 275 nm, el volumen de muestra inyectado fue de 20 µL y un tiempo total de elución para el análisis de 10 minutos, las disoluciones estándar utilizadas se encontraban dentro del intervalo 1 -1000 µg/mL; el límite de detección obtenido fue de 0.1 mg/g y se determinaron 42 mg/g de teobromina en una muestra de polvo de cacao <sup>[32]</sup>.

Otro método usado para la determinación de la teobromina es la cromatografía capilar electrocinética micelar; Injac et al reportan el uso de un sistema de electroforesis capilar HP<sup>3D</sup> con un detector de fotodiodos en serie y controlado por el software ChemStation HP; los compuestos fueron determinados en un capilar de 56 cm (50 cm del detector) x 50 µm diámetro interno de sílice fundida (con celda de burbuja, 150 µm) (Agilent). Las condiciones seleccionadas como adecuadas para todos los compuestos analizados fueron electrolito soporte: 20 mM buffer de fosfatos pH 9.0, conteniendo 80 mM dodecilsulfato sódico (SDS) y 7.5% (v/v) acetonitrilo, la temperatura y el voltaje fueron 25°C y 25 KV respectivamente, la inyección de la muestra se realizó a 250 mbar (el tiempo de inyección fue de 5 s, la presión de 50 mbar) y la detección a 210 nm, las disoluciones estándar utilizadas se realizaron disolviendo 10 mg del analito en 10 mL de agua-metanol (1:1), las cuales a su vez se diluyeron con buffer de fosfatos hasta encontrarse dentro del intervalo 0.5 – 300 mg/L; la linealidad se evaluó con este intervalo de concentraciones para cada compuesto y se eligieron intervalos aceptables con un coeficiente de correlación mayor a 0.9999; en el caso de la teobromina el intervalo lineal va desde 6 – 120 mg/L. El límite de detección para la teobromina fue de 2 mg/L y el límite de cuantificación de 6.7 mg/L, por su parte el porcentaje de teobromina en una muestra de polvo de cacao fue de 0.5% (g/100g) [33].

Como es posible observar, se dispone de métodos muy buenos para la determinación de la teobromina; sin embargo, estos requieren tratamientos laboriosos y el uso de reactivos y equipos de mayor costo que los métodos electroquímicos, los cuales se aplicarán en el presente trabajo.

### **2.8.2- Cafeína.**

Por medio de diferentes técnicas analíticas, se ha logrado la determinación de la cafeína, como es el caso de la cromatografía líquida de alto rendimiento; Lo Coco et al reportan el uso de HPLC de fase reversa acoplada a un detector UV, los componentes fueron separados usando una columna Supelcosil LC-18 (250x4.6 mm, 5 µm, Supelco, Sigma-Aldrich, Milan, Italia) y una precolumna Supelguard LC-18 (20x2.1 mm, Supelco), los análisis se llevaron a cabo utilizando

una elución isocrática a temperatura ambiente con una fase móvil de metanol-agua-ácido acético (80:19:1), a una velocidad de elución de 1 mL/min y una absorbancia de detección UV de 275 nm, el volumen de muestra inyectado fue de 20  $\mu$ L, y un tiempo total de elución para el análisis de 10 minutos, las disoluciones estándar utilizadas se encontraban dentro del intervalo de 1 -100  $\mu$ g/mL; el límite de detección obtenido fue de 0.1 mg/g y se determinaron 6 mg/g de cafeína en una muestra de polvo de cacao <sup>[32]</sup>.

Otro método usado para la determinación de cafeína es la voltamperometría diferencial de impulsos; Amare, M. y Aklog, S., reportan el uso de una estación electroquímica CHI760D (Austin, Texas, USA), donde realizaron los experimentos voltamperométricos. Se utilizó un sistema convencional de tres electrodos, con un electrodo de carbón vítreo (3 mm de diámetro) modificado con lignina como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, realizaron un barrido en sentido positivo a negativo de 8 mV/s y utilizaron una amplitud de pulso de 75 mV; el medio utilizado fue una solución de buffer de acetatos a pH 4, a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Se utilizó una solución 1 mM de cafeína en solución de buffer de acetatos pH 5, de la cual por medio de dilución se obtuvieron soluciones de trabajo de concentración 6, 8, 10, 20, 30, 50, 60, 80 y 100  $\mu$ M de cafeína en buffer de acetatos pH 5.

El pico de corriente anódica de la cafeína mostrado por el electrodo de carbono vítreo modificado con lignina fue linealmente proporcional con la concentración de la cafeína en el intervalo de 6 a  $100 \times 10^{-6}$  mol/L; se obtuvo a su vez un L.D.D. de  $8.37 \times 10^{-7}$  mol/L y un L.D.C. de  $2.79 \times 10^{-6}$  mol/L. Finalmente se determinó un contenido de 10.78 mg de cafeína/g de café para granos de la región de Wolega, en la localidad de Etiopía <sup>[23]</sup>.

## 2.9.- Fundamentos de electroquímica.

### 2.9.1.- La polarografía

Una voltamperometría llevada a cabo con un electrodo de goteo de mercurio se llama polarografía; se mide el voltaje entre el electrodo de trabajo de goteo de mercurio y un electrodo de referencia de calomelano saturado ó Ag/AgCl ó el electrodo normal de hidrogeno (ENH). La corriente se mide entre el electrodo de goteo de mercurio y un electrodo auxiliar inerte. El electrodo clásico de goteo de mercurio consta de un tubo de vidrio capilar largo conectado a un depósito de mercurio, la frecuencia de gotas, que típicamente es de 1 gota cada 1-6 segundos, se controla elevando o bajando el depósito, la gota de mercurio crece continuamente hasta que cae y de nuevo empieza a formarse otra; en equipos modernos, se utiliza una válvula controlada electrónicamente para formar una gota de mercurio, que se mantiene suspendida durante un tiempo en la base del capilar; después de medir la corriente y el voltaje, se desprende la gota mecánicamente, luego se forma una nueva gota y se hace la siguiente medida <sup>[34]</sup>.

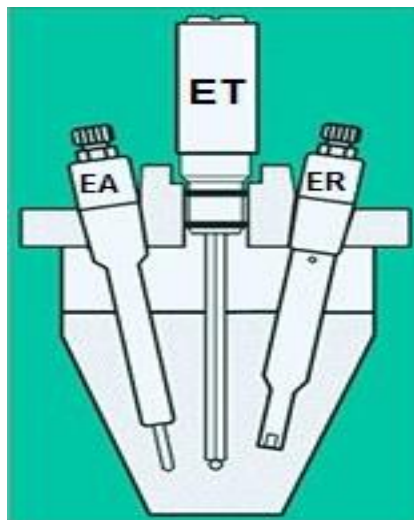


Figura 9.- Celda Polarográfica.  
(Metrohm, 2017)

Se utiliza un electrodo de goteo de mercurio porque la superficie de mercurio, constantemente renovada tiene un comportamiento reproducible de corriente-potencial; con cualquier otro electrodo de trabajo (como Pt), la corriente depende del estado de la superficie del electrodo y por consiguiente de su historia



anterior; otra razón para el uso de este electrodo es que existe un gran sobrevoltaje para la reducción de  $H^+$  en la superficie de Hg; por consiguiente las reacciones que son termodinámicamente menos favorables que la reducción de  $H^+$  se pueden llevar a cabo sin la reducción competitiva de  $H^+$  y en disoluciones neutras o básicas, incluso los cationes de metales alcalinos se reducen más fácilmente que  $H^+$ , a pesar de sus menores potenciales estándar, por lo cual la inmensa mayoría de las reacciones estudiadas con un electrodo de mercurio son reducciones.

### 2.9.2.- El polarograma.

La representación gráfica de la corriente frente al potencial en polarografía se llama polarograma; las corrientes negativas se consideran catódicas (de reducción) y las corrientes positivas se consideran anódicas (de oxidación). Los polarogramas de barrido lineal en condiciones de barrido lento (unos pocos milivoltios por segundo) generalmente tienen la forma de una curva sigmoidea (en forma de  $J$ ), llamada onda polarográfica. La corriente constante después del aumento pronunciado (punto Z en la figura 10), se llama corriente límite  $i_l$ , ya que está restringida por la velocidad con la que el reactivo puede llegar a la superficie del electrodo por procesos de transporte de masa [34,35].

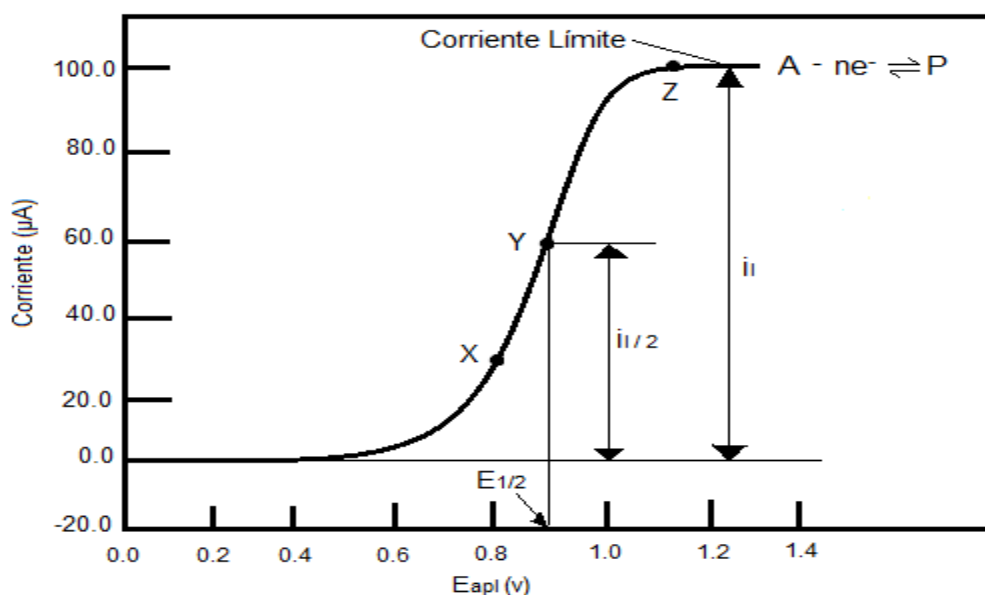


Figura 10.- Ejemplo de polarograma.

En la polarografía se desea que la corriente límite esté controlada únicamente por difusión; al caer cada gota del electrodo goteante de mercurio, se logra una convección constante, además la atracción (o repulsión) electrostática de los iones del analito por el electrodo (migración) se minimiza añadiendo una concentración grande de electrolito soporte.

Como la velocidad de reacción está controlada por la velocidad de difusión y la convección es constante, la corriente límite se llama corriente de difusión convectiva; la velocidad de difusión de un soluto desde el seno de la disolución hasta el electrodo es proporcional a la diferencia de concentración entre las dos regiones; a un potencial suficientemente negativo, la reducción es tan rápida que  $[ ]_e \ll [ ]_0$ , donde  $[ ]_e$  es la concentración en la superficie del electrodo y  $[ ]_0$  es la concentración en el seno de la disolución, por lo cual se tiene que la corriente límite es una corriente de difusión convectiva que es proporcional a la concentración en el seno de la disolución <sup>[34]</sup>.

### **2.9.3.- Aplicaciones de la polarografía en análisis cualitativo y cuantitativo.**

El potencial en el que la corriente es igual a la mitad de la corriente límite se llama potencial de onda media, se simboliza por  $E_{1/2}$  y es el fundamento de las aplicaciones cualitativas de la voltamperometría. Este potencial guarda relación estrecha con el potencial estándar del sistema redox involucrado, si bien no suele ser idéntico a dicha constante; los potenciales de media onda a veces son útiles para identificar los componentes de una disolución.

La proporcionalidad entre la corriente de difusión y la concentración del soluto en la disolución es el fundamento de las aplicaciones cuantitativas de la polarografía; para medir la corriente de difusión ( $i_d$ ) en un polarograma, se resta la corriente residual de la corriente límite en la región controlada por difusión; la corriente residual se mide con un blanco que contiene el mismo electrolito soporte que las disoluciones con analito <sup>[34]</sup>.

### 2.9.4.- Estudio matemático de las ondas polarográficas

Consideraciones sobre la cinética de transferencia de carga [36]:

El transporte de carga es el otro proceso de la reacción al electrodo que incluye la etapa en la que la carga pasa a través de la interfase. Su velocidad para una reducción (ecuación 1) y para una oxidación (ecuación 2) se muestra a continuación:

Ecuación 1:

$$V_{Red} = K^0 e^{\left(\frac{-\alpha n F}{RT}(E-E^0)\right)} C_{Ox}^S$$

Ecuación 2:

$$V_{Ox} = K^0 e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E^0)\right)} C_{Red}^S$$

Donde:

$K^0$  = constante estándar heterogénea de velocidad de transferencia de electrones.

$n$  = número de electrones transferidos.

$T$  = temperatura.

$F$  = constante de Faraday,  $F = 96485.34 \text{ C mol}^{-1}$ .

$E^0$  = potencial normal de la especie.

$E$  = potencial aplicado.

$\alpha$  = coeficiente de transferencia de electrones.

$C_{Ox}^S$  = concentración del oxidante en la superficie del electrodo.

$C_{Red}^S$  = concentración del reductor en la superficie del electrodo.

Para conocer la corriente total, se tienen que tomar las contribuciones de corriente catódica y anódica mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 3

$$I_{Total} = nFAK^0(V_{Red} - V_{Ox})$$

De la ecuación 3 se puede obtener fácilmente una relación de  $i - E$ , sustituyendo las ecuaciones 1 y 2 en la ecuación 3 se obtiene la ecuación 4:

Ecuación 4

$$I_{Total} = nFAK^0 \left\{ C_{Ox} \left[ e^{\left(\frac{-\alpha n F}{RT}(E-E^0)\right)} \right] - C_{Red} \left[ e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E^0)\right)} \right] \right\}$$

Si se tienen condiciones de equilibrio la intensidad de corriente total es cero, pues la velocidad de reducción se iguala a la velocidad de oxidación, consecuentemente al despejar  $E$ , que será el potencial en condiciones de equilibrio ( $E_{eq}$ ), se obtiene:

Ecuación 5

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{C_{ox}}{C_{Red}} \right)$$

La ecuación 5 es la ecuación de Nernst; es válida sólo en condiciones de equilibrio, esto es cuando  $I_{Total} = 0$ .

Si se muestrea la corriente a un tiempo definido (llamado  $\tau$ ) se obtiene un registro del tipo  $i_{difusión} = f(E_\tau)$ , este tipo de voltamperometría permite realizar un análisis interesante al aproximar la ecuación de Cottrell (ecuación 6) a un estado en que la concentración de la especie electroactiva al electrodo presenta un gradiente lineal de concentración (ecuaciones 7 y 8):

Ecuación 6

$$i(t) = \frac{nFAD_{ox}^{1/2}C_{ox}^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2}$$

Ecuación 7

$$i = -nK_{Ox}[C_{Ox}^* - C_{Ox}^s]$$

Ecuación 8

$$i = nK_{Red}[C_{Red}^* - C_{Red}^s]$$

Donde:

$n$  = número de electrones transferidos.

$K_{Ox}$  y  $K_{Red}$  = constantes de difusión según los parámetros de Cottrell.

$C_{Ox}^s$  = concentración del oxidante en la superficie del electrodo.

$C_{Red}^s$  = concentración del reductor en la superficie del electrodo.

$C_{Ox}^*$  = concentración del oxidante en la solución.

$C_{Red}^*$  = concentración del reductor en la solución.

A tiempos suficientemente largos  $C^s \rightarrow 0$ , entonces la corriente de oxidación y reducción estará limitada por la difusión (ecuaciones 9 y 10):

Ecuación 9

$$i_{Ox} = -nK_{Ox}C_{Ox}^*$$

Ecuación 10

$$i_{Red} = nK_{Red}C_{Red}^*$$

Al sustituir las ecuaciones 9 y 10 sobre la ecuación de Nernst (ecuación 5), se llega a la expresión siguiente:

Ecuación 11

$$E = E^0 + \frac{0.06V}{\alpha n} \log \frac{i(\tau) - i_{Ox}}{i_{Red} - i(\tau)} + \frac{0.06V}{\alpha n} \log \frac{K_{Red}}{K_{Ox}}$$

Si se considera que el coeficiente de difusión de la especie oxidante tiene un valor similar al coeficiente de difusión de la especie reductora, sucede uno de los siguientes casos:

Para una disolución que contiene sólo el oxidante el análisis voltamperométrico en sentido catódico se ajusta a la siguiente expresión:

Ecuación 12

$$E = E^0 + \frac{0.06V}{\alpha n} \log \frac{i(\tau) - i_{Ox}}{-i(\tau)}$$

Para una disolución que contiene sólo el reductor, el análisis voltamperométrico en sentido anódico se ajusta a la siguiente expresión:

Ecuación 13

$$E = E^0 + \frac{0.06V}{\alpha n} \log \frac{i(\tau)}{i_{Red} - i(\tau)}$$

Donde  $i(\tau)$  representa la corriente muestreada en un tiempo ( $\tau$ ), en pulso de potencial tal que la corriente no se encuentre limitada por difusión. Ambas ecuaciones reciben el nombre de ecuaciones de Heyrovský-Ilkovic para electroreducción y electrooxidación respectivamente.

La función  $E = f\left(\frac{i(\tau) - i_{Ox}}{-i(\tau)}\right)$  es una línea recta y se utiliza como un criterio de reversibilidad pues la pendiente debe ajustarse a  $m = \frac{2.303RT}{\alpha nF}$

Por lo cual si se representa el potencial aplicado E, contra  $\log \frac{i - i_{Ox}}{-i}$  se obtendrá una línea recta.

El potencial al cual el término  $\log \frac{i-i_0}{-i}$  se hace cero, corresponde al potencial de semi-onda ( $E_{1/2}$ ); el valor de la pendiente permite obtener el número de electrones ( $n$ ) intercambiados en el proceso, además de relacionarse con la cinética de la reducción, dado que permite observar si el proceso cumple con la ecuación de Nernst de manera ideal o no; si cumple con la ecuación de Nernst se habla de un sistema electroquímicamente reversible [36,37].

### 2.9.5.- Polarografía diferencial de impulsos.

La polarografía de corriente continua y la de muestreo de corriente tienen un límite de detección de alrededor de  $10^{-5}$  mol/L y pueden resolver especies cuyos potenciales de onda media difieren en unos 0.2 V; la polarografía diferencial de impulsos disminuye el límite de detección a  $10^{-7}$  mol/L y resoluciones de 0.05 V [34].

La polarografía diferencial de impulsos utiliza pequeños impulsos superpuestos a una rampa lineal de voltaje; la altura de un impulso se llama amplitud de modulación, estos impulsos de una magnitud de 5 - 100 mV se aplican durante los últimos 60 ms de la vida de la gota de mercurio, después de lo cual se desprende mecánicamente la gota; se mide la corriente una vez antes de aplicar el impulso y otra vez durante los 17 últimos ms de cada impulso, el potencióstato resta la primera corriente de la segunda y representa esta diferencia frente al potencial aplicado (medido justo antes del impulso de voltaje). El polarograma diferencial de impulsos resultante se parece, en la forma, a la derivada del polarograma de corriente continua.

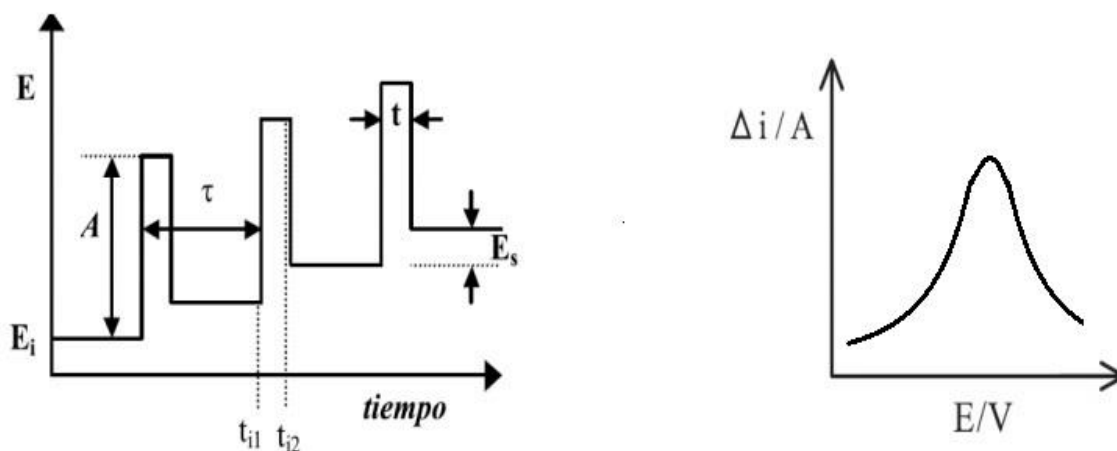


Figura 11.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos

El aumento de sensibilidad de la polarografía diferencial de impulsos en relación con la polarografía de corriente continua se debe al aumento de la corriente faradaica y a la disminución de la corriente capacitiva. Al aplicar un impulso se provoca un aumento brusco de especie electroactiva en el electrodo de trabajo, originando así un salto de corriente faradaica, cuando reacciona el analito, disminuye la concentración y desaparece la corriente faradaica; en el instante en que se aplica el impulso, también aumenta la corriente capacitiva para cargar la gota, cuando esta se carga, la corriente capacitiva disminuye más rápidamente que la corriente faradaica; en el tiempo que se mide la corriente total, la corriente capacitiva es prácticamente nula, mientras que la corriente faradaica todavía es importante.

En análisis cuantitativo se mide la corriente en la altura del pico de un polarograma diferencial de impulsos y se resta la corriente residual al mismo potencial medido en ausencia de analito.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Establecer las bases para la determinación de los componentes principales de cacao (teobromina, cafeína, azúcares reductores) mediante métodos electroquímicos analíticos, los cuales podrán establecer una calidad relativa.

#### **3.2 Objetivos particulares.**

Realizar el análisis electroquímico fundamental de teobromina y cafeína, con la finalidad de tener un panorama general de sus procesos electroquímicos.

Determinar las condiciones que permitan la cuantificación de teobromina, cafeína y cationes de metales pesados (Cu, Cd, Zn, Pb y As) mediante polarografía.

Determinar la constante de reparto de teobromina y cafeína en extracciones liquido-liquido de agua cloroformo.

Separar los analitos teobromina y cafeína de un extracto de granos de cacao mediante extracción por par de disolventes.

Cuantificar el contenido de teobromina, cafeína y cationes metálicos (Cu, Cd, Zn, Pb y As) en una muestra de granos de cacao.

Determinar contenido de azúcares reductores totales y sacarosa invertida en la muestra de cacao por el método de Fehling.



## 4 Metodología

### 4.1 Reactivos

Reactivo	Pureza	Marca comercial
Fosfato de potasio monobásico	R.A.	J.T. Baker
Teobromina	R.A.	Sigma Aldrich
Cafeína	R.A.	Sigma Aldrich
Glucosa	Grado alimenticio	Cosmopolita
Ácido nítrico	65%	Merck
Cloroformo	99.8%	Sigma Aldrich
Hexano	99.7%	J.T. Baker
Ácido clorhídrico	36.5%	J.T. Baker
CuSO <sub>4</sub>	R.A.	J.T. Baker
Tartrato de Sodio y Potasio	R.A.	J.T. Baker
NaOH	R.A.	J.T. Baker
KNO <sub>3</sub>	R.A.	J.T. Baker
Cobre electrolítico	-----	-----
Óxido de Zinc	Q.P.	Monterrey
Nitrato de Cadmio	R.A.	Mallinckrodt
Nitrato de Plomo	R.A.	Metrohm
Trióxido de Arsénico	Q.P.	Monterrey

### 4.2 Disoluciones

Determinación de teobromina y cafeína en cacao	
Disolución	Concentración (mol/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5x10 <sup>-1</sup>
Teobromina	2.27x10 <sup>-3</sup>
Cafeína	1x10 <sup>-2</sup>

Determinación de azúcares reductores y sacarosa invertida en cacao	
Disolución	Concentración (mol/L)
Glucosa	1.57x10 <sup>-2</sup>
CuSO <sub>4</sub> (Disolución A de Fehling)	2.29x10 <sup>-1</sup>
Tartrato y NaOH (Disolución B de Fehling)	1.2 y 2.5

Determinación de cationes en cacao	
Disolución	Concentración (mol/L)
HNO <sub>3</sub> /KNO <sub>3</sub>	1x10 <sup>-1</sup>
Estándar Cu (II)	6x10 <sup>-3</sup>
Estándar Zn (II)	3.06x10 <sup>-3</sup>
Estándar Cd (II)	8.90x10 <sup>-5</sup>
Estándar Pb (II)	1x10 <sup>-3</sup>
Estándar As (V)	1.33x10 <sup>-3</sup>

### 4.3 Equipo

Balanza analítica, espátula metálica, molino para café Braun, refrigerante, matraces bola, parrilla de calentamiento/agitación Corning PC-420D, embudo buchner, matraz kitasato, papel Whatman, extractor soxhlet, agitador magnético, matraces volumétricos de 50.0 mL, 10.0 mL y 5.0 mL, centrífuga clínica CIVEQ 80-2, embudo de separación, micropipetas de 10, 100 y 1000 µL, pipetas volumétricas de 1.0 mL, 2.0 mL y 10.0 mL, termómetro de 0-110°C, potenciostato 797 VA Computrace, potenciostato Tacussel, programa 797 VA Computrace 1.2., electrodo de trabajo de gotas de mercurio, electrodo de referencia de Ag/AgCl<sub>2</sub>, electrodo auxiliar de Pt, horno Krups.

### 4.4 Muestra Analizada.

Muestra	Región	Aspecto	Año de cosecha
Granos de cacao	Tabasco	Sólido, color café-violeta	2017

## **4.5 Experimentación.**

### **Determinación de los siguientes compuestos:**

#### **Determinación de humedad**

Se procedió a determinar el porcentaje de humedad de la muestra mediante gravimetría, para lo cual se utilizó un horno eléctrico para secar la muestra a 120 °C por un periodo de 1:30 horas, después de lo cual las muestras en sus recipientes se llevaron a un desecador hasta alcanzar peso constante, obteniendo así el porcentaje de humedad por diferencia de peso; los cálculos se encuentran en la sección 9.3 de anexos.

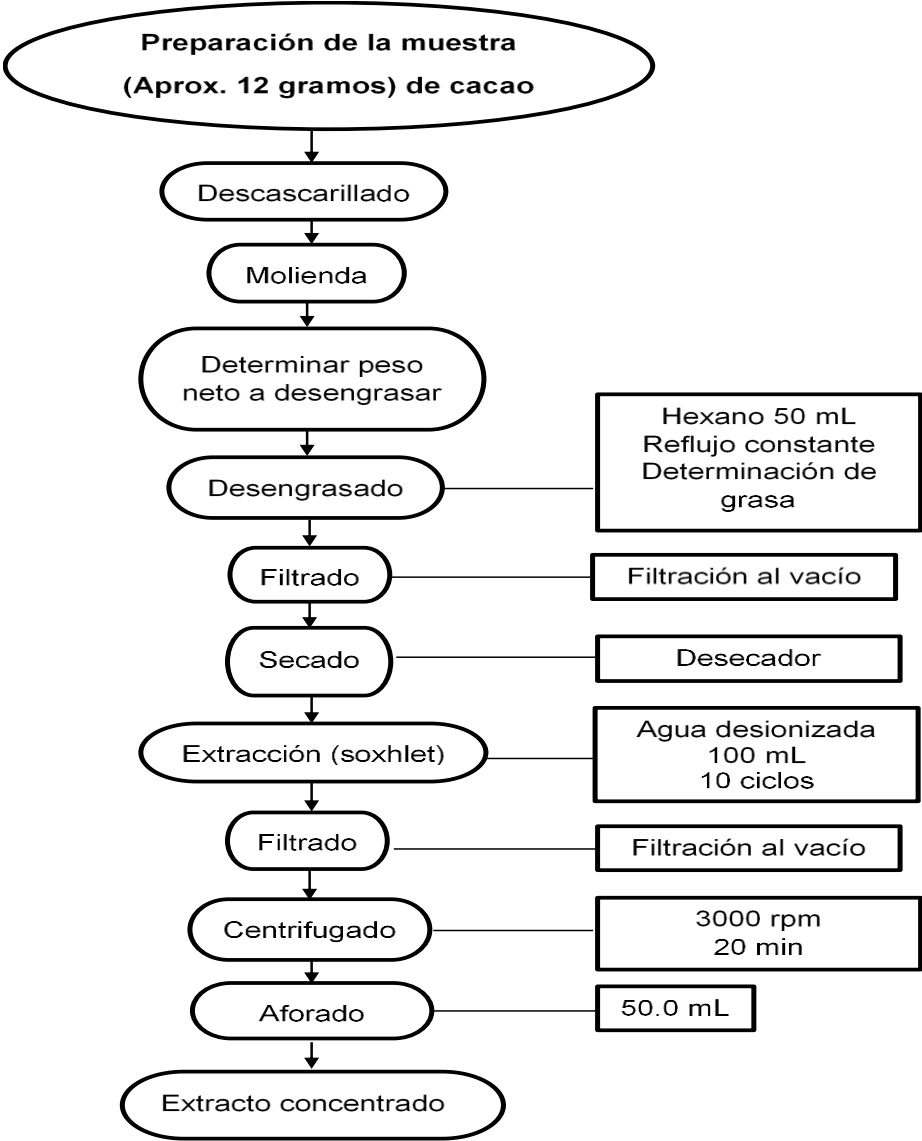
**Teobromina y cafeína:** Determinación electroquímica, mediante polarografía diferencial de impulsos. Para asegurar la menor interferencia entre ambos, se planteó la separación de ambos analitos mediante extracciones sucesivas, se procedió a utilizar cloroformo como disolvente debido a la alta solubilidad reportada para la cafeína en este disolvente (181 g/L de cloroformo), por su parte la teobromina es reportada como prácticamente insoluble en el mismo; sin embargo, dada la similitud de la estructura de ambos analitos se procedió a calcular la constante de reparto de ambos.

#### **Preparación de la muestra para determinación de teobromina y cafeína.**

Para el análisis de la muestra, primero se pesaron 11.97 g de cacao con cascarilla, se sometieron a un descascarillado manual; el cacao sin cascarilla se pesó, obteniendo 10.67 g, este cacao descascarillado fue sometido a molienda, con la ayuda de un molino eléctrico; una vez obtenida una molienda fina, se pesó el polvo de cacao obteniendo 10.60 g. Con la finalidad de quitar grasas que pudieran entorpecer el análisis, el polvo de cacao se sometió a un desengrasado, el cual consistió en mantenerlo en reflujo con 50 mL de Hexano por 1 hora, después de lo cual el polvo se filtró al vacío y se llevó a un desecador por toda la noche para eliminar los restos de Hexano que aun pudieran estar presentes en el polvo de cacao, una vez libre del Hexano, se volvió a pesar el polvo de cacao obteniendo 5.97 g. Este polvo de cacao desengrasado representa un porcentaje de 56% de la

semilla (lo que implica un 44% de manteca); para extraer los analitos de interés del polvo de cacao desengrasado, se sometió a un proceso de extracción utilizando un cartucho de algodón y un equipo soxhlet; como disolvente se utilizaron 100 mL de agua desionizada, la extracción se mantuvo hasta que se alcanzaron 10 ciclos de reflujo; terminado el proceso de extracción, se filtró al vacío la materia sólida del extracto; sin embargo, aún era apreciable la presencia de sólidos en el extracto, por lo cual se sometió el extracto a centrifugación a 3000 rpm por un tiempo de 20 minutos; la fase líquida se recolecto y se llevó a un aforo de 50.0 mL.

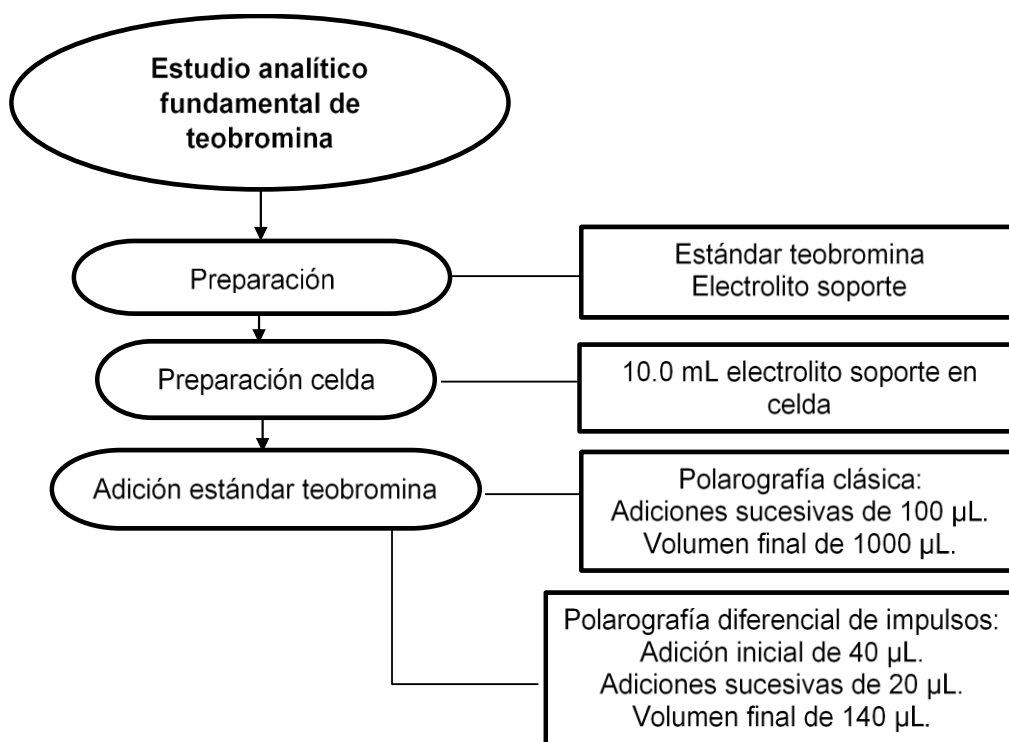
El diagrama de flujo de este proceso se presenta a continuación.



## Estudio electroquímico fundamental de la teobromina.

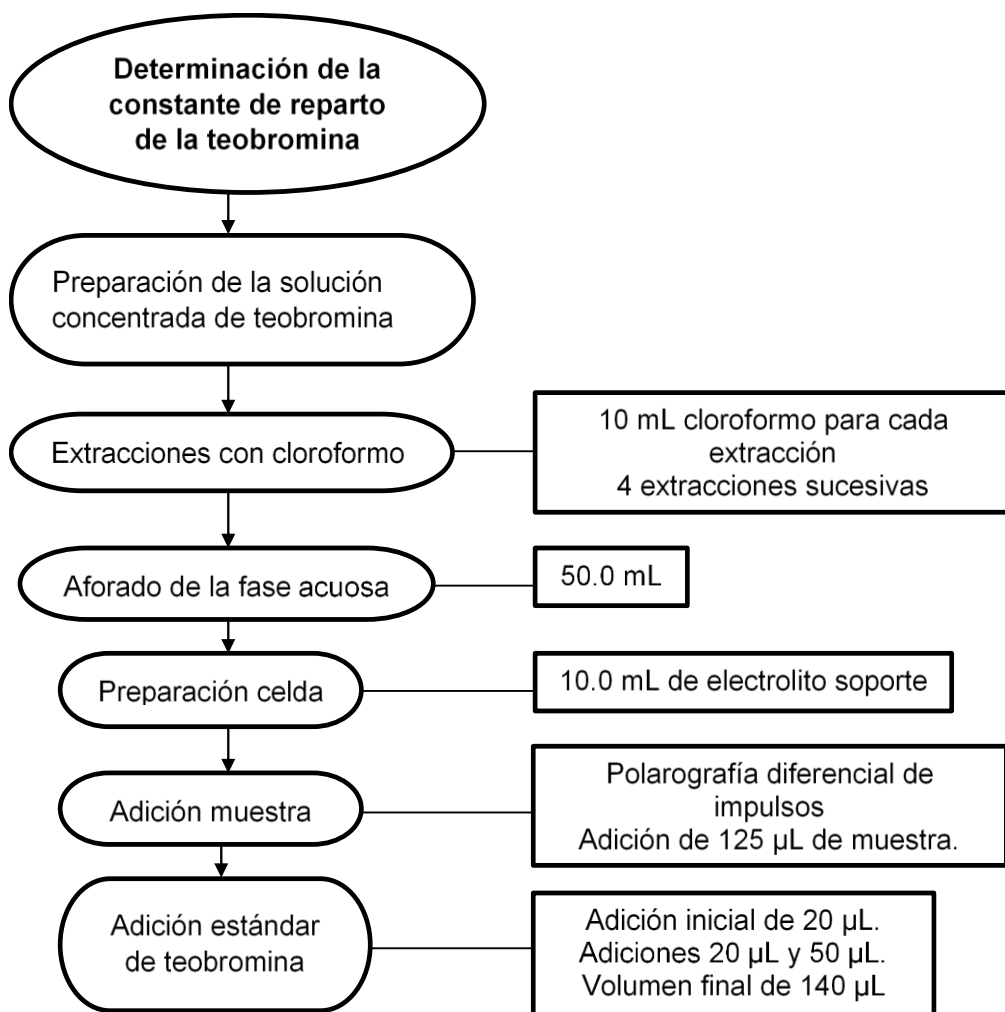
Para el estudio analítico fundamental del estándar de teobromina, se preparó una disolución de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L; del electrolito soporte  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, se vertieron 10.0 mL en la celda del potencióstato; se añadió un poco del electrolito soporte en la camisa del electrodo de referencia (Ag/AgCl), se realizó un examen para corroborar el buen funcionamiento eléctrico de los electrodos y se hizo la purga con  $\text{N}_2$  durante 5 minutos, se establecieron las condiciones del análisis, para el caso de polarografía clásica: El barrido se realizó de positivos a negativos, el intervalo de trabajo fue desde 100 mV hasta -1500 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, para esta determinación se realizaron adiciones sucesivas de 100  $\mu\text{L}$  hasta llegar a un volumen de 1000  $\mu\text{L}$

Para el caso de polarografía diferencial de impulsos: El barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo fue desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido de 3.4 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 80 ms, para esta determinación se realizó 1 adición inicial de 40  $\mu\text{L}$ , y se continuó con adiciones sucesivas de 20  $\mu\text{L}$  hasta llegar a un volumen de 140  $\mu\text{L}$  adicionados.



## Determinación de la constante de reparto de la teobromina.

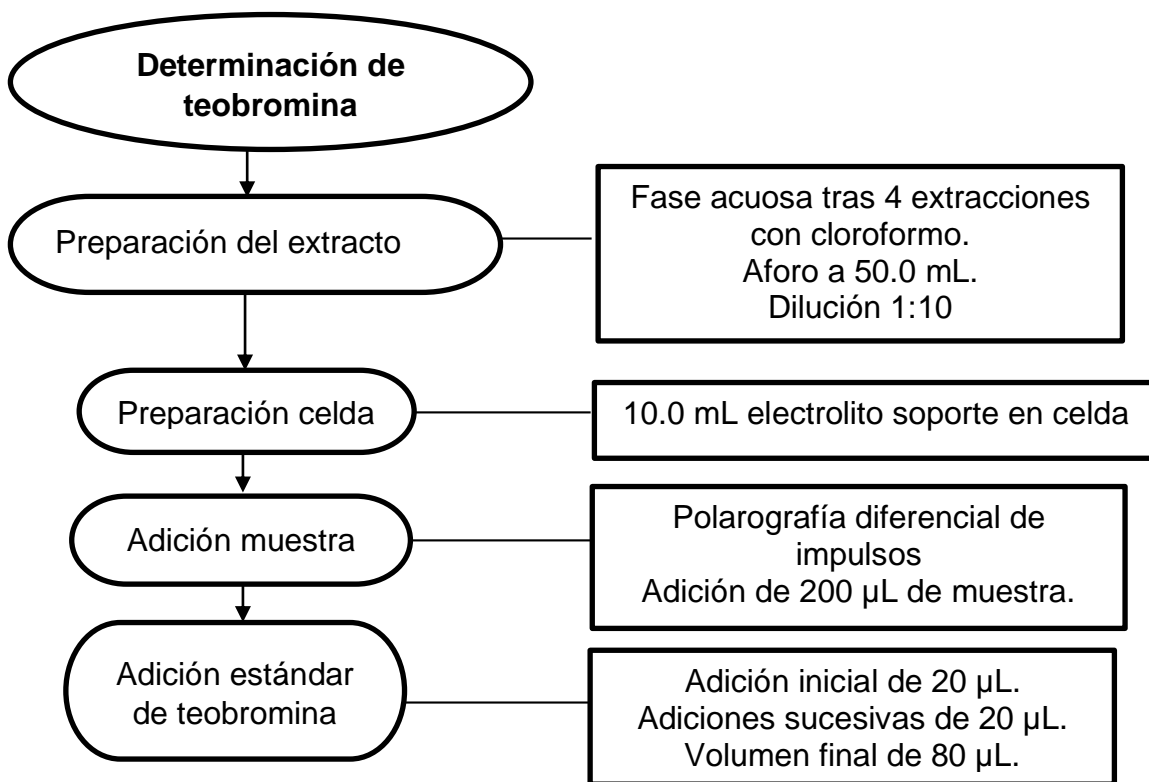
Para determinar la constante de reparto de la teobromina se partió de 50.0 mL de disolución de teobromina de concentración  $1.47 \times 10^{-3}$  mol/L, a la cual se le realizaron 4 extracciones sucesivas con cloroformo, cada extracción consistió de 10 mL de cloroformo; la fase acuosa se sometió a calentamiento moderado para eliminar cualquier resto de cloroformo y se llevó a un aforo de 50.0 mL, de esta fase acuosa se tomaron alícuotas y se determinó la concentración de la teobromina mediante el uso de un potencióstato, la técnica de polarografía diferencial de impulsos y un estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L. El LDD determinado para la teobromina es de  $1.94 \times 10^{-6}$  mol/L.



## Determinación de teobromina en el extracto.

Para determinar la teobromina en los granos de cacao, se partió del extracto obtenido de la preparación de la muestra; este extracto se sometió a 4 extracciones con 10 mL de cloroformo cada una, a la fase acuosa se le retiró el cloroformo residual mediante calentamiento ligero y se llevó a un aforo de 50.0 mL; sin embargo, al ser aún bastante concentrada la solución, se llevó a una dilución 1:10. Posteriormente se vertieron 10.0 mL del electrolito soporte en la celda del potencióstato, se añadió un poco del electrolito soporte en la camisa del electrodo de referencia (Ag/AgCl), se realizó un examen para asegurar un correcto funcionamiento eléctrico de los electrodos y la purga con N<sub>2</sub>.

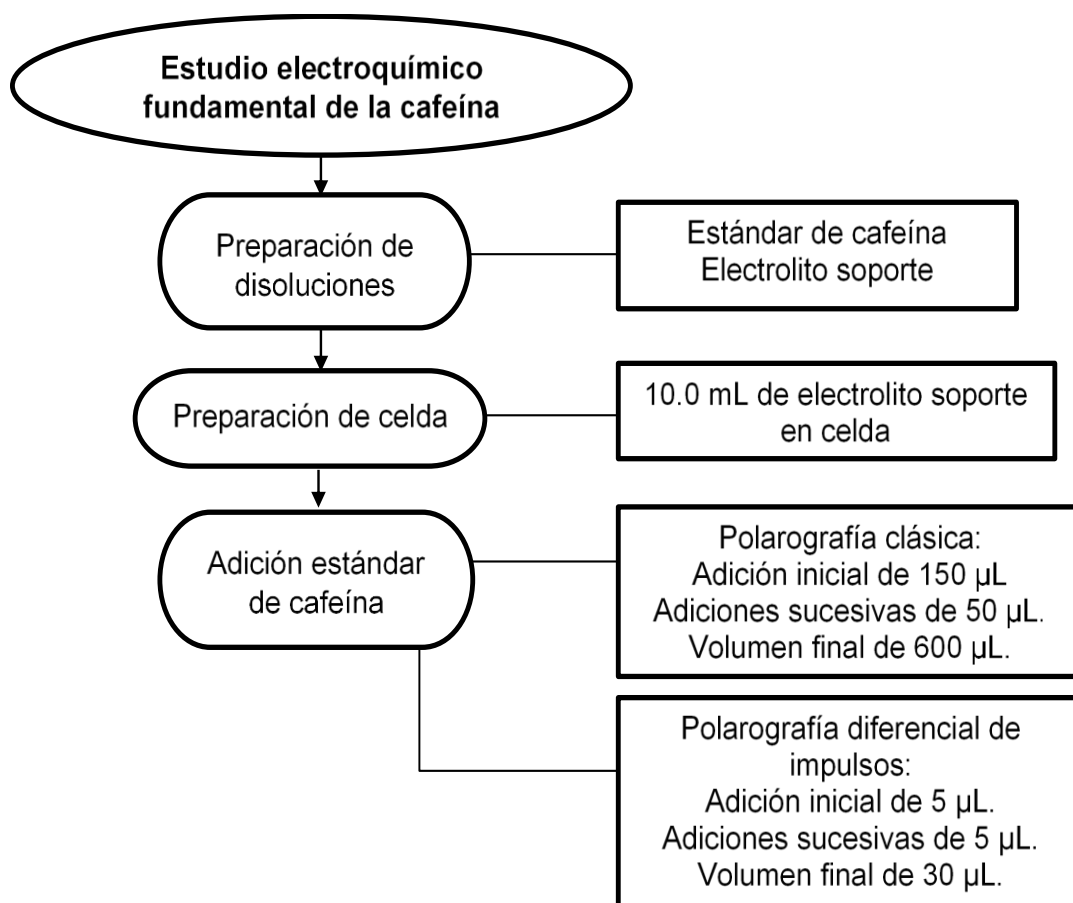
Se establecieron las condiciones del análisis: velocidad de barrido de 3.4 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 80 ms. Una vez obtenida la curva propia del electrolito soporte, se adicionaron 200 µL de la dilución 1:10 de la fase acuosa y después se realizaron adiciones sucesivas de 20 en 20 µL del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L hasta llegar a un volumen de 80 µL del estándar.



## Estudio electroquímico fundamental de la cafeína

Para el estudio electroquímico fundamental del estándar de cafeína, se preparó una disolución de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L; se vertieron 10.0 mL del electrolito soporte  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, en la celda del potenciostato; se añadió un poco del electrolito soporte en la camisa del electrodo de referencia (Ag/AgCl), se realizó una prueba para corroborar el buen funcionamiento de los electrodos y se hizo la purga con  $\text{N}_2$ . Se establecieron las condiciones del análisis, para el caso de polarografía clásica: velocidad de barrido de 5 mV/s.

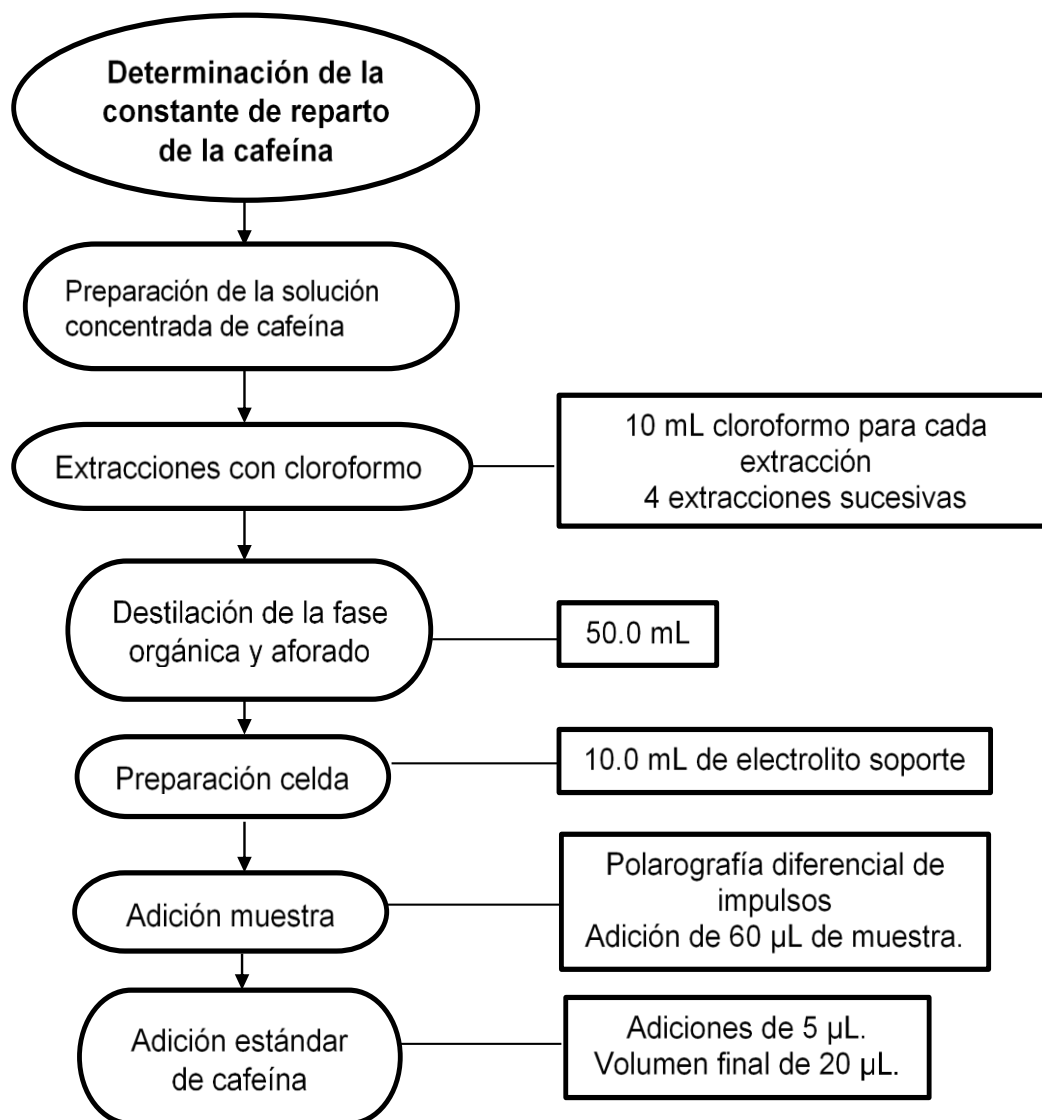
Para el caso de la polarografía diferencial de impulsos se empleó una velocidad de barrido de 3.4 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 80 ms. Para esta determinación se realizaron adiciones sucesivas de 5 en 5  $\mu\text{L}$  hasta llegar a un volumen final de 30  $\mu\text{L}$  de estándar adicionados.





## Determinación de la constante de reparto de la cafeína.

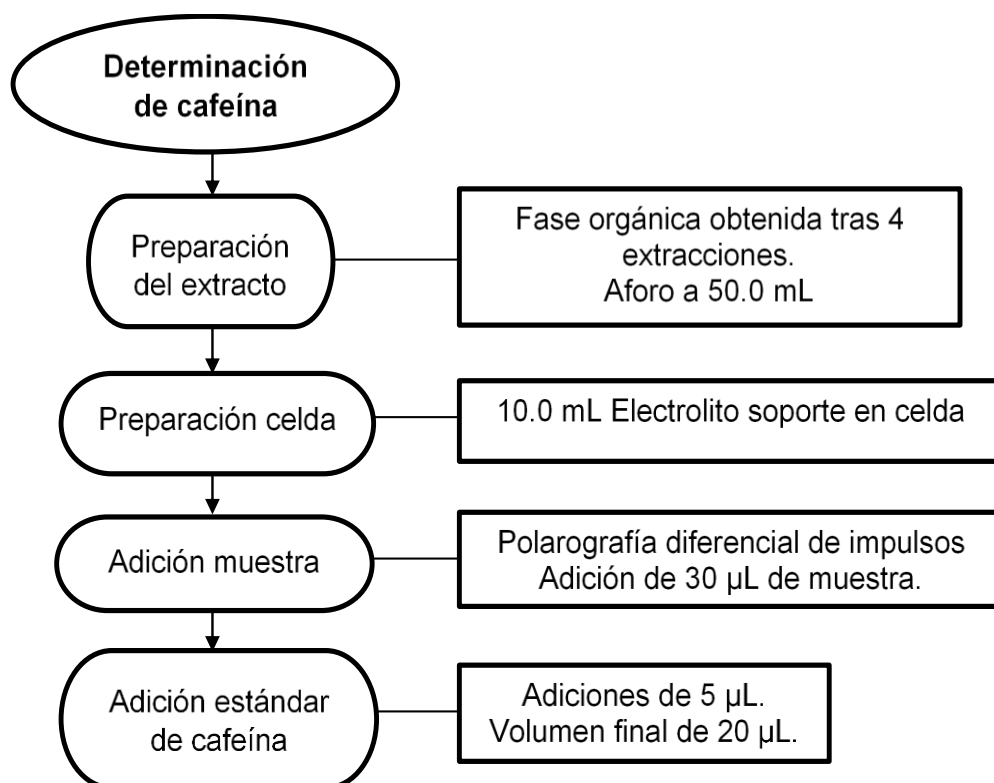
Para el caso de la cafeína se procedió de forma similar a la determinación de la constante de reparto de la teobromina. Se partió de 50 mL de una disolución de cafeína de concentración  $1.45 \times 10^{-3}$  mol/L; se le realizaron 4 extracciones sucesivas con cloroformo, cada extracción consistió de 10 mL de cloroformo, se destiló el cloroformo de la fase orgánica y se llevó a un aforo de 50.0 mL con agua desionizada, de esta disolución acuosa se tomaron alícuotas que permitieron determinar la concentración de la cafeína mediante el uso de un potencióstato, la técnica de polarografía diferencial de impulsos y un estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L; el LDD determinado para la cafeína es de  $3.75 \times 10^{-6}$  mol/L.



## Determinación de cafeína en el extracto.

Para determinar la cafeína en los granos de cacao, se partió del extracto obtenido de la preparación de la muestra; este extracto se sometió a 4 extracciones con 10 mL de cloroformo cada una; a la fase orgánica se le retiró el cloroformo mediante destilación y se redisolvieron los analitos en agua desionizada, finalmente se llevó a un aforo de 50.0 mL. Posteriormente se vertieron 10.0 mL del electrolito soporte en la celda del potencióstato, se añadió un poco del electrolito soporte en la camisa del electrodo de referencia (Ag/AgCl), se realizó un test a los electrodos y la purga con N<sub>2</sub>.

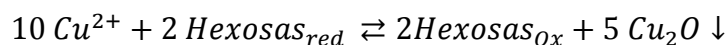
Se establecieron las condiciones del análisis: velocidad de barrido de 3.4 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 80 ms. Una vez obtenida la curva residual, se adicionaron 30 µL de la disolución acuosa y después se realizaron adiciones sucesivas de 5 en 5 µL del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L hasta llegar a un volumen de 20 µL del estándar.

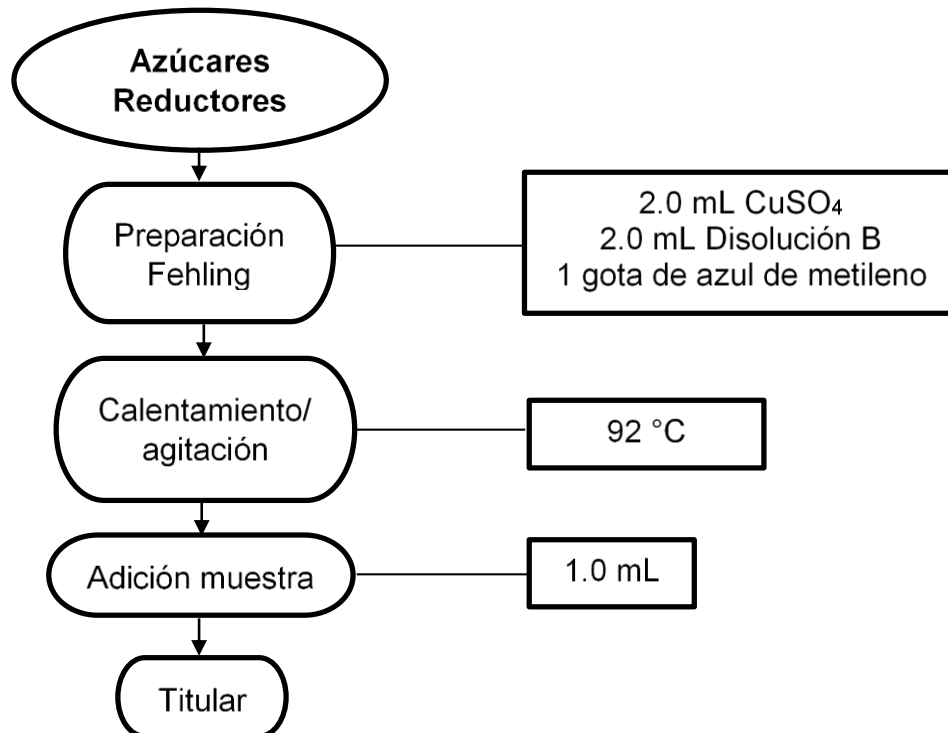


## Determinación por retroceso de azúcares reductores

Para determinar los azúcares reductores en la muestra, en primer lugar se procedió a preparar las disoluciones A y B de Fehling y la disolución de glucosa  $1.57 \times 10^{-2}$  mol/L; la disolución A de Fehling se valoró mediante polarografía por adiciones patrón (ver sección 9.4 de Anexos).

Posteriormente, en una celda de trabajo se adicionaron 2 mL de la disolución A, 2 mL de la disolución B y 1 gota de azul de metileno (este indicador se adicionó para corroborar el vire del indicador en la cercanía del término de la reacción a pesar de que la reacción se siguió potenciométricamente), se adicionó un poco de agua desionizada, se montó el sistema con el electrodo de trabajo de cobre, el electrodo de referencia de Ag/AgCl y un termómetro, se aplicó calentamiento y agitación, hasta alcanzar una temperatura de 92 °C, al alcanzar la temperatura óptima, se adicionó 1.0 mL del extracto previo a las extracciones con cloroformo, posteriormente se realizaron adiciones de la disolución de glucosa  $1.57 \times 10^{-2}$  mol/L hasta visualizar el fin de la reacción. Se obtuvo una curva de potencial vs volumen la cual fue transformada en una curva de potencial vs mol; con ella se determinó la cantidad de Cu(II) que estaba en exceso después de que el  $\text{CuSO}_4$  reaccionara con los azúcares reductores; por medio de la estequiometría de la reacción se determinó la cantidad de azúcares reductores en la muestra. Se conoce que la reacción entre la glucosa (una Hexosa reductora) y el  $\text{Cu}^{2+}$  tiene una relación de 10 cobres por 2 Hexosas, es decir, una relación 5:1, y que el punto de equivalencia se encuentra a 5/6 del salto de potencial <sup>[38]</sup>.





#### **Determinación por retroceso de sacarosa invertida.**

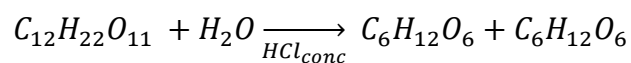
Para determinar la sacarosa invertida en la muestra, en un vaso de precipitados se tomó 1.0 mL del extracto sin descafeinar, se le agregaron 3 gotas de HCl concentrado y se dejó reposar toda la noche, al siguiente día, se realizó el mismo procedimiento que para azúcares reductores totales.

Al alcanzar la temperatura óptima, se adicionó la muestra hidrolizada; posteriormente se realizaron adiciones de la disolución de glucosa  $1.57 \times 10^{-2}$  mol/L hasta visualizar el fin de la reacción de la glucosa con el Cu(II).

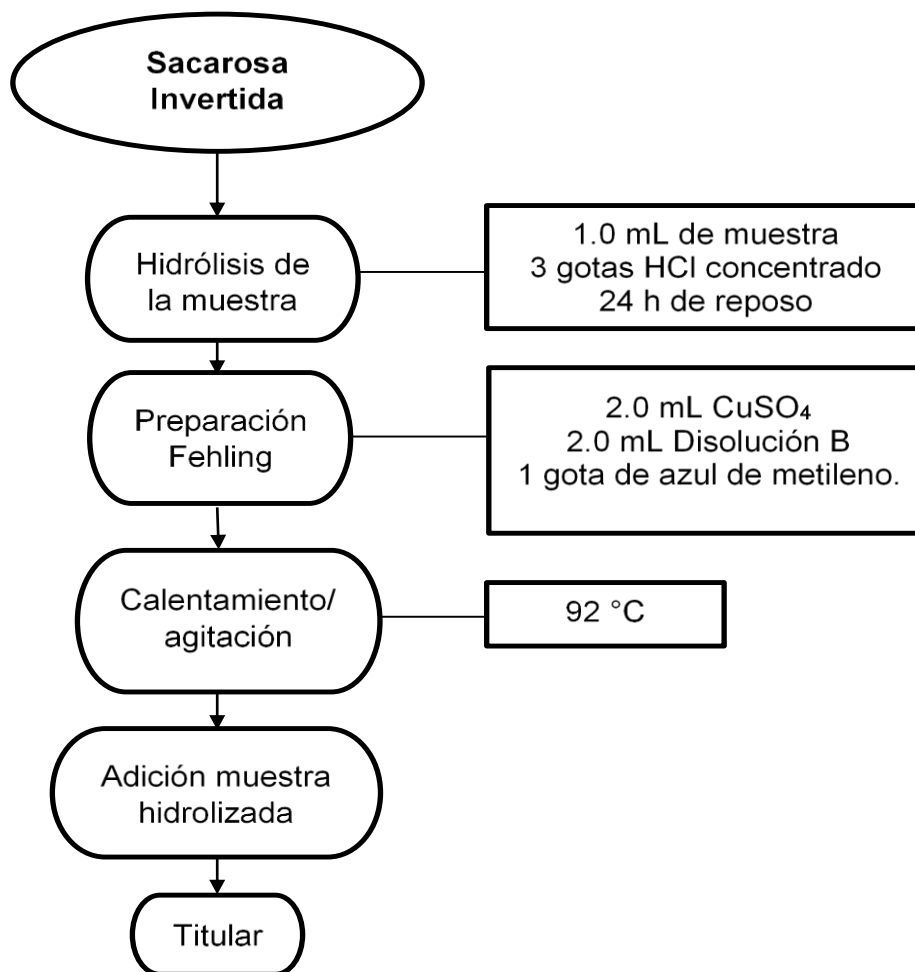
Se obtuvo una curva de potencial vs volumen la cual fue transformada en una curva de potencial vs mol; con ella se determinó la cantidad de Cu(II) que estaba en exceso después de que el CuSO<sub>4</sub> reaccionara con los azúcares reductores. Por medio de la estequiometría de la reacción se determinó la cantidad de azúcares reductores en la muestra.

Una vez obtenidos los azúcares reductores totales, se le restó la cantidad de azúcares reductores libres obtenidos previo a la hidrólisis, después se convirtieron

estos azúcares reductores restantes a sacarosa, teniendo en cuenta que 1 molécula de sacarosa equivale a 2 azúcares reductores.

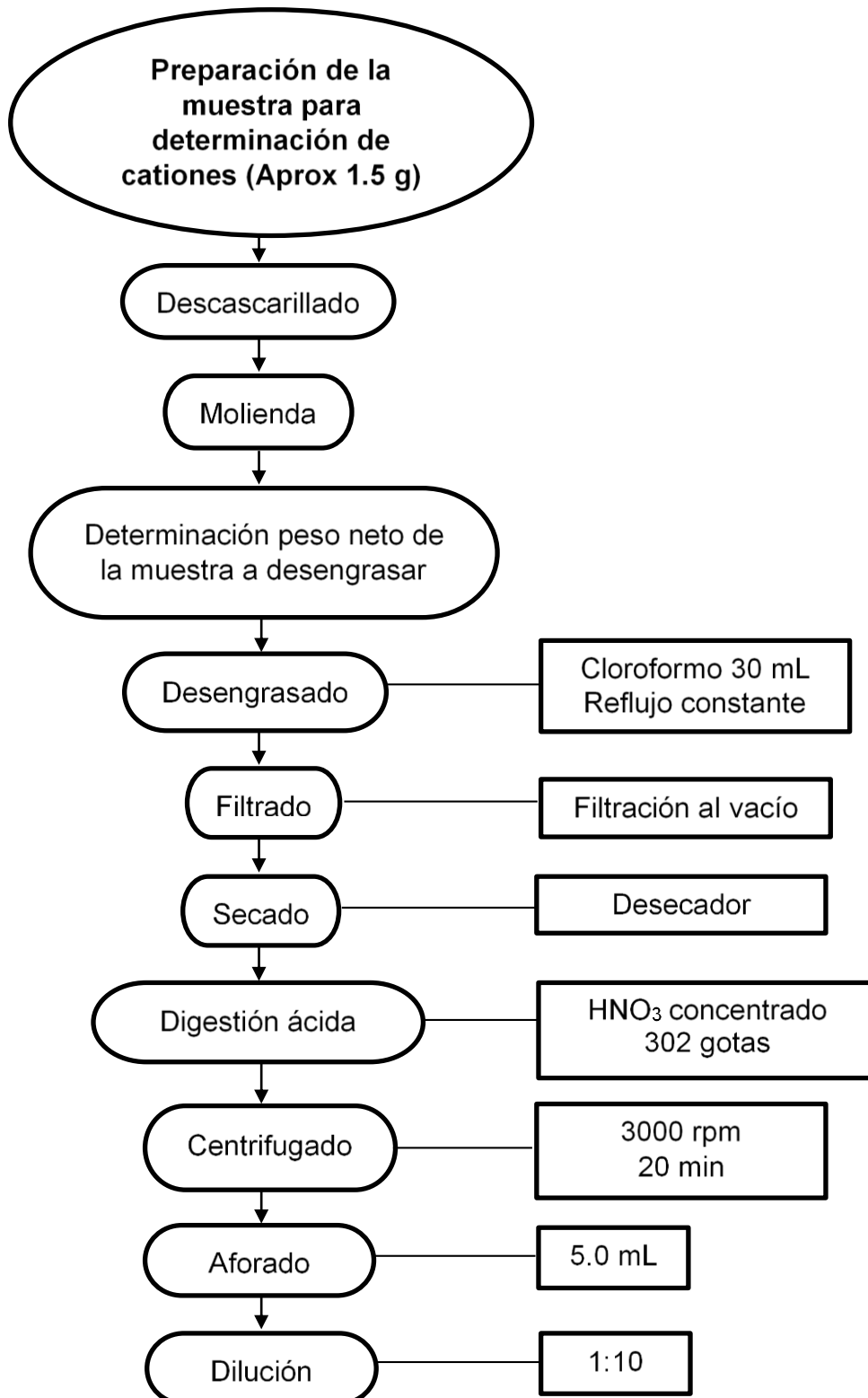


*Sacarosa* → *Glucosa* + *Fructosa*



### **Preparación de la muestra para determinación de cationes.**

Para el análisis de la muestra, primero, se pesaron 1.44 g de cacao con cascarilla, se sometieron a un descascarillado manual, el cacao sin cascarilla se pesó, obteniendo 1.22 g. Este cacao descascarillado fue sometido a molienda, con la ayuda de un molino eléctrico, una vez obtenida una molienda fina, se pesó el polvo de cacao obteniendo 1.20 g; con la finalidad de quitar grasas que pudieran entorpecer el análisis, el polvo de cacao se sometió a un desengrasado, el cual consistió en mantenerlo en reflujo con 30 mL de cloroformo por 1 hora, después de lo cual el polvo se filtró al vacío y se llevó a un desecador por toda la noche para eliminar los restos de cloroformo que aun pudieran estar presentes en el polvo de cacao; una vez libre del cloroformo, se volvió a pesar el polvo de cacao y se obtuvieron 0.64 g. Para extraer los analitos de interés, el polvo de cacao se sometió a un proceso de digestión ácida utilizando aproximadamente 15 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado, en un sistema consistente de un matraz Kitasato, un embudo de separación para adicionar de forma gradual el  $\text{HNO}_3$ , un agitador magnético y una trampa de captura con  $\text{NaOH}$  conectada a vacío. El tiempo total de la digestión fue de 4 horas 17 minutos, el  $\text{HNO}_3$  se fue agregando gradualmente y se determinó el final de la digestión cuando no se apreció más el  $\text{NO}_2$  ni burbujeo en la trampa de captura de  $\text{NaOH}$ ; terminado el proceso de digestión, se sometió el extracto a centrifugación a 3000 rpm por un tiempo de 20 min, la fase líquida se recolectó y se llevó a un aforo de 5.0 mL; sin embargo, al realizar el análisis se encontró que esta disolución estaba demasiado concentrada, por lo cual se le realizó una dilución 1:10.



## **Estudio electroquímico fundamental de cationes.**

Para la elaboración del estudio electroquímico fundamental del Cu(II), Cd(II), Zn(II) Pb(II) y As(V), se utilizaron estándares de Cu(II)  $6 \times 10^{-3}$  mol/L, Cd(II)  $8.90 \times 10^{-5}$  mol/L, Zn(II)  $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L, Pb (II)  $1 \times 10^{-3}$  mol/L y As(V)  $1.33 \times 10^{-3}$  mol/L, y el electrolito soporte  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$   $1 \times 10^{-1}$  mol/L; se vertieron 10.0 mL del electrolito soporte en la celda del potencióstato, se añadió un poco del electrolito soporte en la camisa del electrodo de referencia (Ag/AgCl), se verificó el buen funcionamiento eléctrico del sistema y se realizó la purga con  $\text{N}_2$ ; se establecieron las condiciones del análisis.

Para el caso de polarografía diferencial de impulsos: Velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms. Se adicionaron 70  $\mu\text{L}$ , 3200  $\mu\text{L}$ , 70  $\mu\text{L}$ , 120  $\mu\text{L}$  y 2500  $\mu\text{L}$  totales de Cu(II), Cd(II), Zn(II) Pb(II) y As(V) respectivamente.

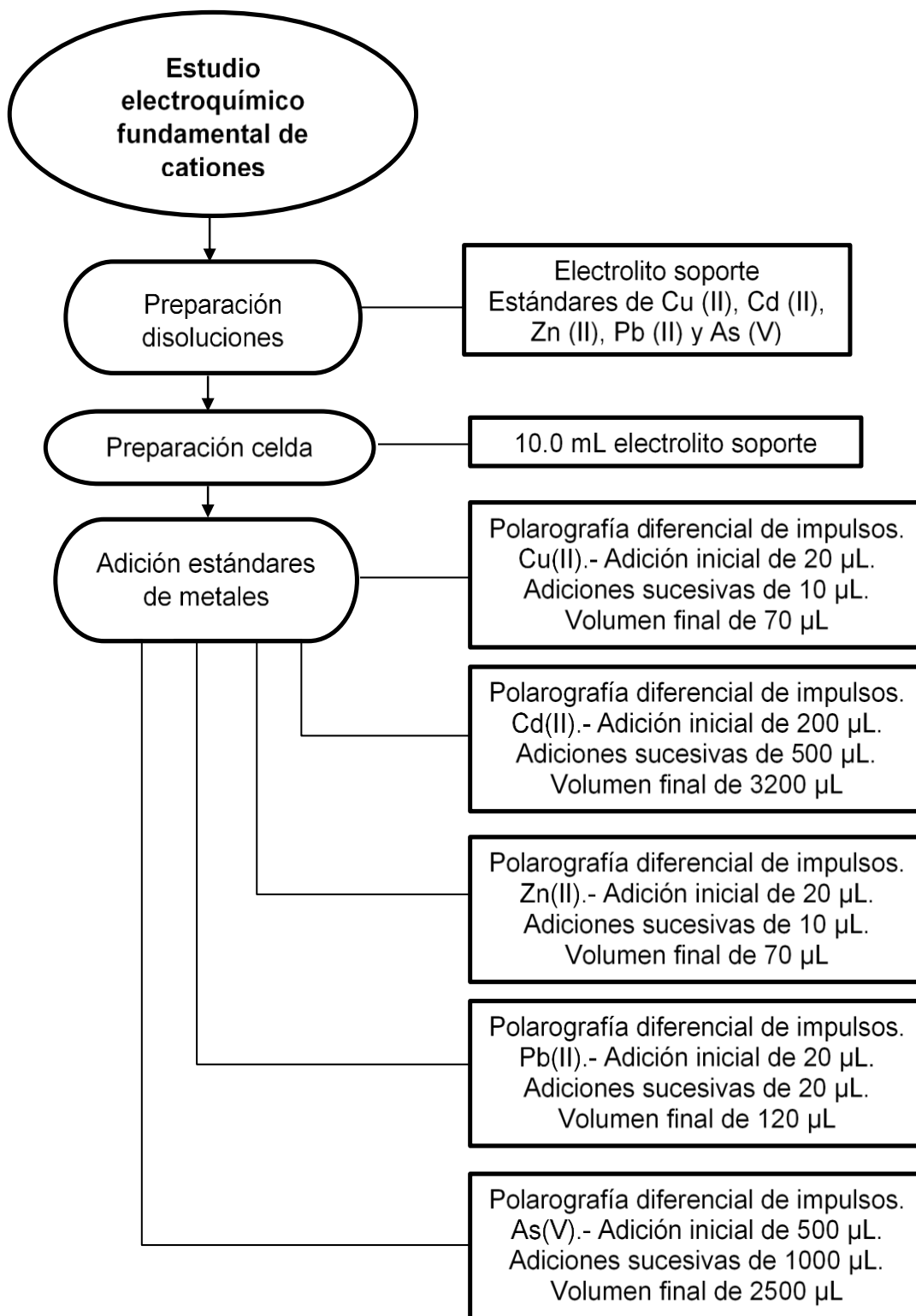
Los LDD y LDC obtenidos para cada catión, se presentan en la sección 9.5 de anexos.

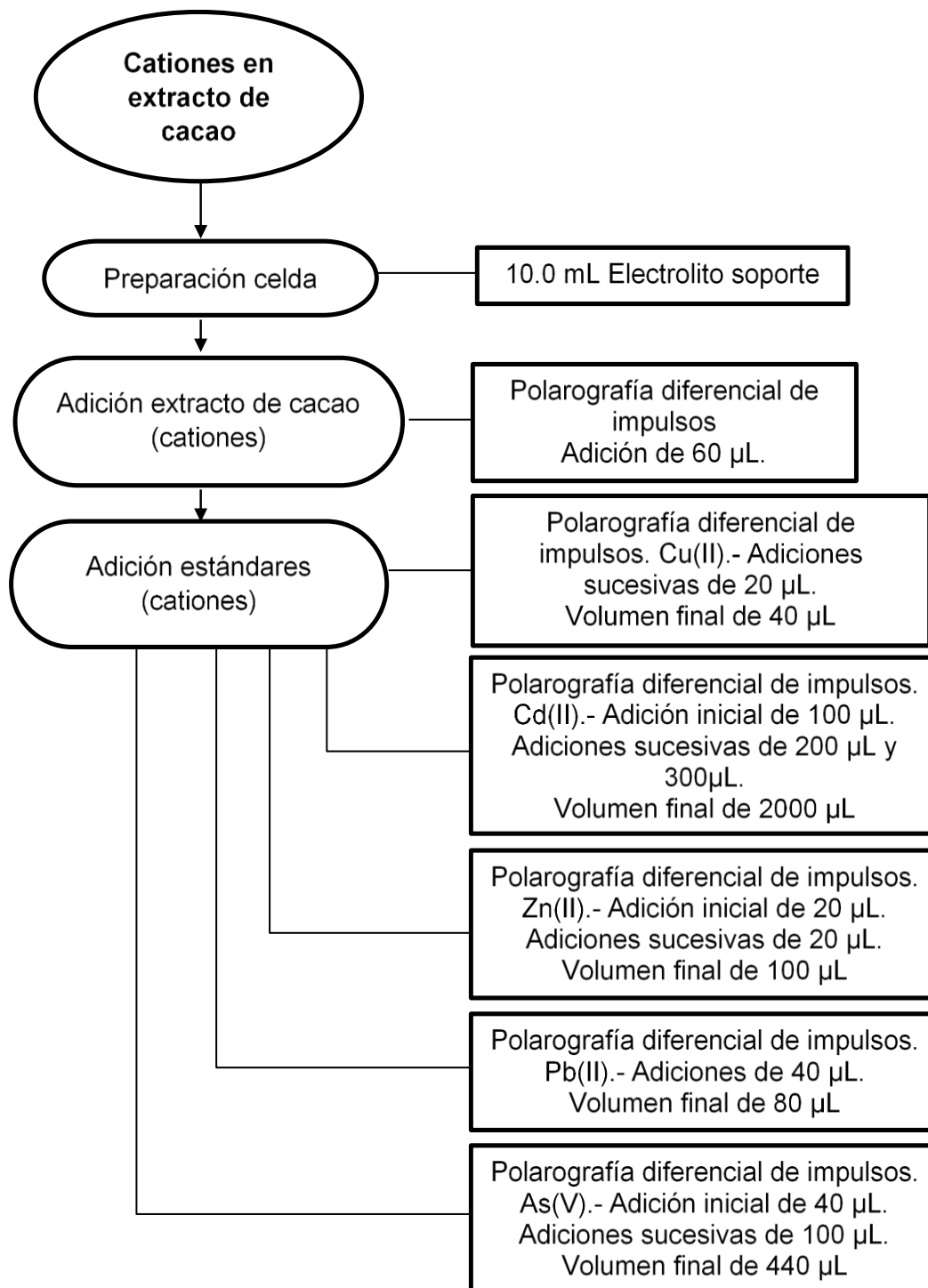
Determinación de cationes en la muestra.

Se partió de la dilución obtenida de la preparación de la muestra de granos de cacao para cationes, se vertieron 10.0 mL del electrolito soporte  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$   $1 \times 10^{-1}$  mol/L en la celda del potencióstato, se añadió un poco del electrolito soporte en la camisa del electrodo de referencia (Ag/AgCl), se realizó una comprobación del buen funcionamiento eléctrico del sistema y la purga con  $\text{N}_2$ . Se establecieron las condiciones del análisis: El barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo fue desde 264 mV hasta -1300 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms.

Una vez obtenida la curva del electrolito soporte, se adicionaron 60  $\mu\text{L}$  de la dilución de la muestra de cacao y después se añadieron los estándares de Cu(II), Cd(II), Zn(II) Pb(II) y As(V) hasta llegar a un volumen final de 40  $\mu\text{L}$ , 2700  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 80  $\mu\text{L}$  y 440  $\mu\text{L}$  totales respectivamente.







## 5 Resultados y Análisis

### 5.1 Análisis fundamental para la determinación de teobromina y cafeína.

El primer parámetro electroquímico que se estableció, fue el dominio de electroactividad del electrolito soporte  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L planteado para la determinación de los analitos de interés. Este se logró al realizar un barrido catódico de potencial desde 370 hasta -1700 mV, con una velocidad de barrido de 5 mV/s, en una celda electroquímica que contenía 10.0 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L. Como se muestra en la figura 12, el dominio de electroactividad para este medio es muy amplio y va desde -1600 mV aproximadamente hasta cerca de 370 mV para polarografía clásica y desde -1640 mV aproximadamente hasta cerca de 280 mV para polarografía diferencial de impulsos.

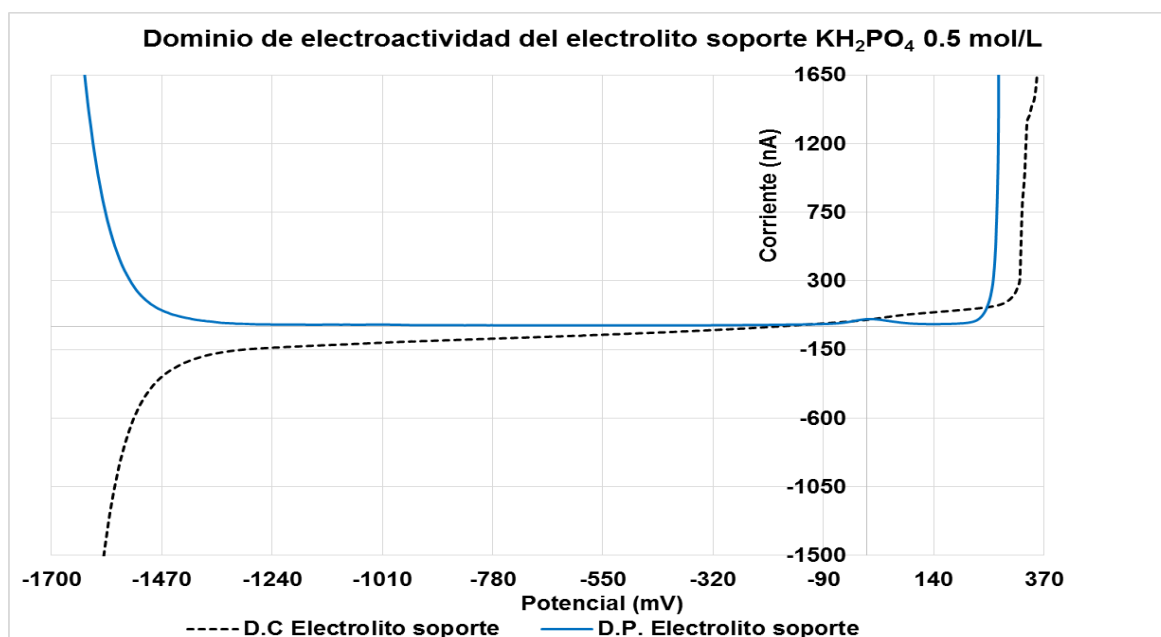


Figura 12.- Ejemplo de polarogramas clásico y diferencial de impulsos de la corriente generada por el electrolito soporte  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L. Para el caso de polarografía clásica: Barrido de positivos a negativos, velocidad de barrido de 5 mV/s, tamaño de gota de 9. Para el caso de polarografía diferencial de impulsos: Barrido de positivos a negativos, velocidad de barrido de 5 mV/s, tamaño de gota 9, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms.

## 5.2 Estudio electroquímico fundamental de la teobromina y la cafeína.

### 5.2.1 Teobromina

Se llevó a cabo el estudio del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L mediante polarografía clásica y diferencial de impulsos; se obtuvieron los siguientes resultados:

En la figura 13, se puede observar la corriente generada por el electrolito soporte seleccionado  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , así como la corriente generada por la adición de alícuotas del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L, alcanzando una concentración de teobromina en celda de  $2.27 \times 10^{-4}$  mol/L; en esta curva se distingue una señal, en un potencial de -127 mV, que incrementa con las adiciones del estándar; esta señal genera una corriente negativa, lo que indica que la señal observada es una reducción.

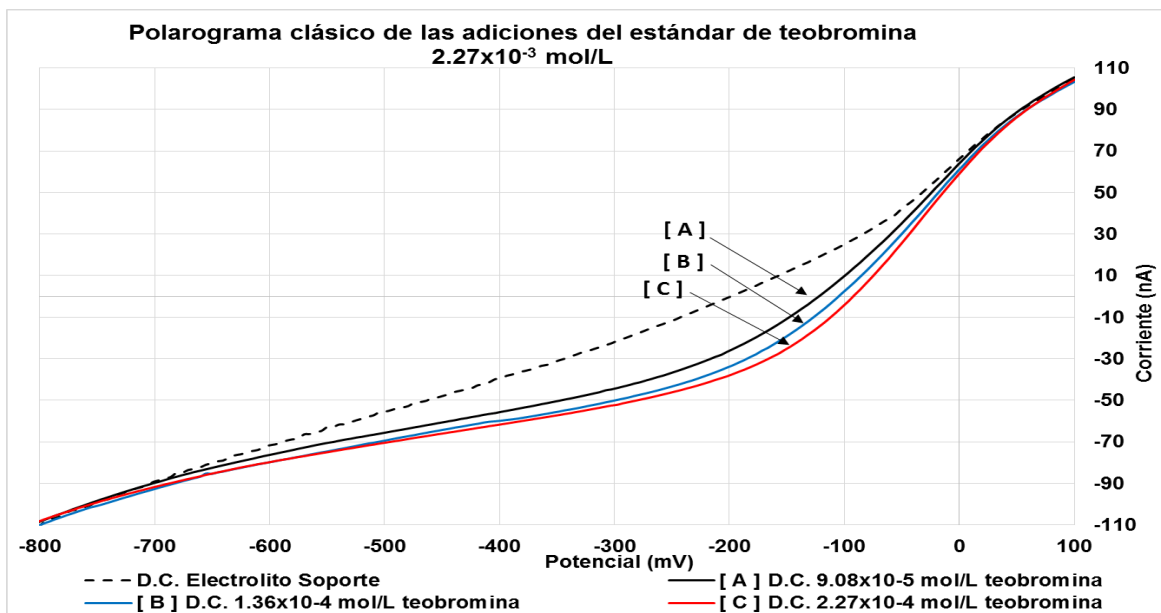


Figura 13.- Ejemplo de polarograma clásico con el intervalo recortado de las adiciones de alícuotas del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L, en un electrolito soporte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El barrido se realizó de positivos a negativos, el intervalo de trabajo fue desde 100 mV hasta -1500 mV, la velocidad de barrido es de 5 mV/s y el tamaño de gota usado fue de 9.

La señal con potencial de -127 mV es dependiente de la concentración de teobromina presente en la celda; sin embargo, no es una señal ideal pues se extiende por más de 150 mV y presenta intensidades de corriente muy pequeñas, lo cual no permite determinar adecuadamente la corriente límite con esta técnica, lo que dificulta el análisis logarítmico de la señal; pese a ello, se aplicó el análisis logarítmico mostrado en la sección 9.1.1 de anexos, para tener un panorama general del proceso.

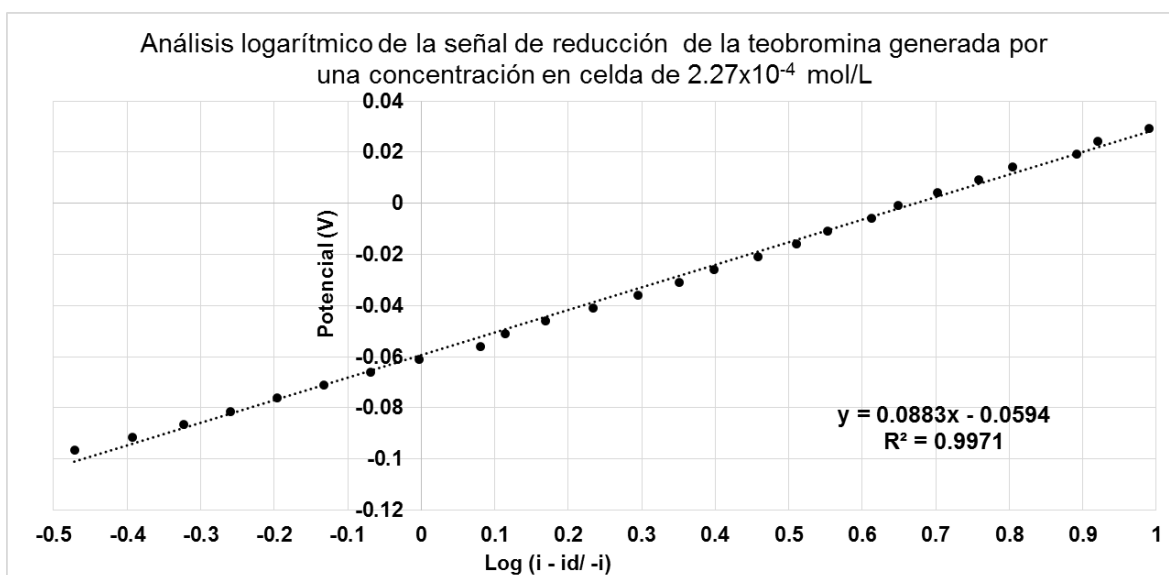


Figura 14.- Análisis logarítmico de la señal de reducción en el potencial de -127 mV generada por una concentración en celda de  $2.27 \times 10^{-4}$  mol/L de teobromina.

El valor de la ordenada al origen para el análisis logarítmico (figura 14) indica que la señal de reducción posee un  $E_{1/2} = -0.059$  V y ya que el valor de la pendiente de la recta es 0.0883, que es mayor a 0.059, se puede considerar que la reducción del sistema en este potencial no se comporta conforme a la ley de Nernst por lo cual no se trata de un sistema reversible.

Al emplear la técnica de polarografía diferencial de impulsos se observó una señal con potencial de pico en -127 mV; se realizaron mediciones de la corriente de pico generada por adiciones del estándar de teobromina con la finalidad de determinar el límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC) del analito, ya que esta técnica sí permite alcanzar límites más bajos que la polarografía clásica.

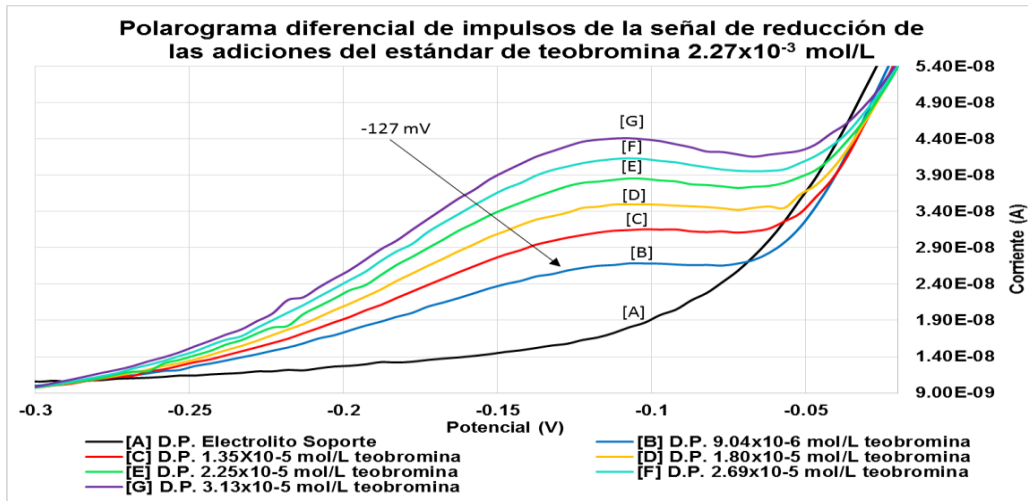


Figura 15.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado para la señal generada por las adiciones del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L, en un electrolito soporte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo fue desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido fue de 3.4 mV/s, la amplitud del pulso de -50 mV y el tiempo del pulso de 80 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4.

En la figura 15, se observa el incremento de la intensidad de corriente en la señal de potencial de pico de -127 mV, debido a las adiciones del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L, por lo que la altura de pico fue utilizada para determinar el LDD y el LDC. Los resultados se muestran en la figura 16, la cual se realizó con los datos obtenidos del polarograma de la figura 15.

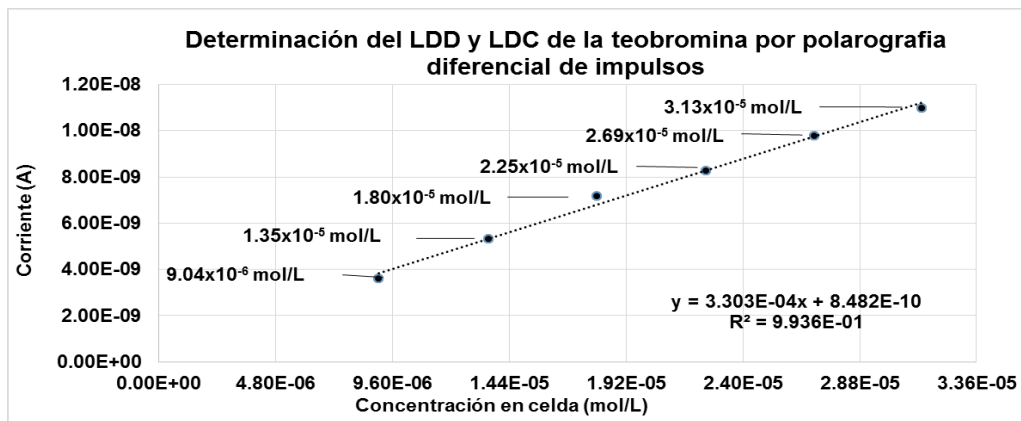


Figura 16.- Determinación del LDD y LDC del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L en el potencial de pico de -127 mV.

Resultado de la gráfica de la figura 16, se obtiene la ecuación 14

$$Y = 3.303 \times 10^{-4} X + 8.482 \times 10^{-10}$$

Ecuación 14.- Ecuación de la recta obtenida al realizar el gráfico de adiciones patrón del estándar de teobromina.

Con esta ecuación se obtuvieron los valores para calcular el LDD y LDC con base a lo reportado por Miller y Miller <sup>[39]</sup>. Las fórmulas utilizadas para el cálculo se encuentran en el anexo 9.2.1. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6.- LDD y LDC obtenidos para la teobromina

Potencial (mV)	LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
-127	$1.94 \times 10^{-6}$	0.35	$6.45 \times 10^{-6}$	1.16

Con estos datos se puede apreciar que bajo estas condiciones la polarografía diferencial de impulsos, permite detectar teobromina a partir de <1 ppm y cuantificar a partir de 1.2 ppm.

A continuación se procedió a determinar el porcentaje de teobromina de una muestra de granos de cacao provenientes de la región de Tabasco, como se muestra en la sección 5.4.

## 5.2.2 Cafeína

Se llevó a cabo el estudio del estándar de cafeína  $3 \times 10^{-3}$  mol/L mediante polarografía clásica y se obtuvieron los siguientes resultados:

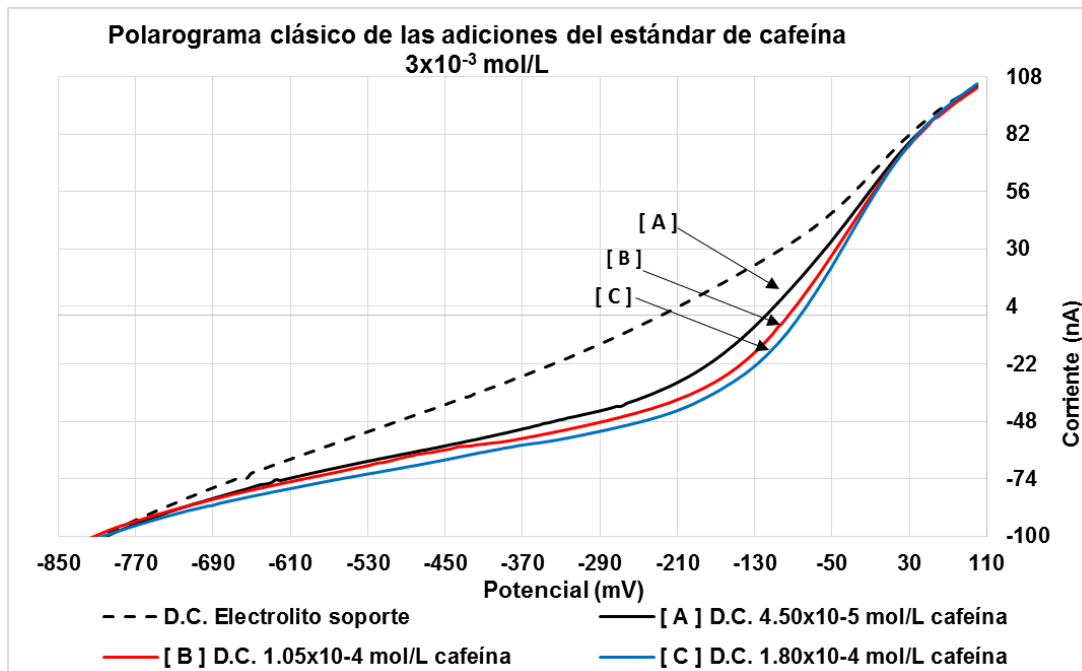


Figura 17.- Ejemplo de polarograma clásico con el intervalo recortado de las adiciones del estándar de cafeína  $3 \times 10^{-3}$  mol/L, en un electrolito soporte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El barrido se realizó en el sentido de positivos a negativos, el intervalo de trabajo fue desde 100 mV hasta -1500 mV, la velocidad de barrido fue de 5 mV/s y el tamaño de gota utilizado fue de 9.

En la figura 17, se puede observar la señal generada por la adición de alícuotas del estándar de cafeína  $3 \times 10^{-3}$  mol/L, hasta alcanzar una concentración de cafeína en celda de  $1.80 \times 10^{-4}$  mol/L.

En esta curva se distingue una señal en un potencial de -117 mV; esta señal genera una corriente negativa, lo que nos indica que la señal observada es una reducción.

Esta no es una señal ideal pues se extiende por más de 150 mV y presenta intensidades de corriente muy pequeñas, lo cual no permite determinar adecuadamente la corriente límite en este polarograma, lo que dificulta el análisis logarítmico del polarograma; pese a ello, se aplicó el análisis logarítmico que se



aprecia en la sección 9.1.2 de anexos, con la finalidad de tener un panorama general del proceso.

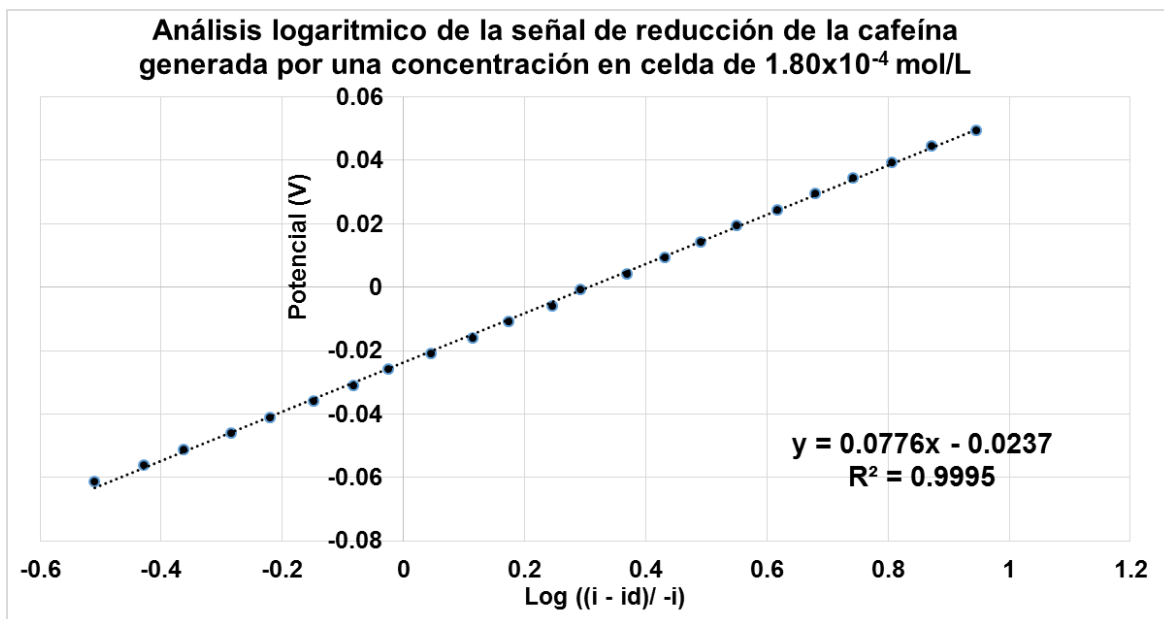


Figura 18.- Análisis logarítmico de la señal de reducción en el potencial de -117 mV generada por una concentración en celda de  $1.80 \times 10^{-4}$  mol/L de cafeína.

El valor de la ordenada al origen para el análisis logarítmico (figura 18) indica que la señal de reducción posee un  $E_{1/2} = -0.0237$  V y ya que el valor de la pendiente de la recta es 0.0776, que es mayor a 0.059, se puede considerar que la reducción del sistema en este potencial no se comporta conforme a la ley de Nernst lo cual indica que este sistema no es reversible.

Al utilizar la técnica de polarografía diferencial de impulsos y un estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L se realizaron mediciones de corriente de reducción de la cafeína en la zona de potenciales alrededor de -117 mV con la finalidad de determinar el LDD y el LDC del analito.

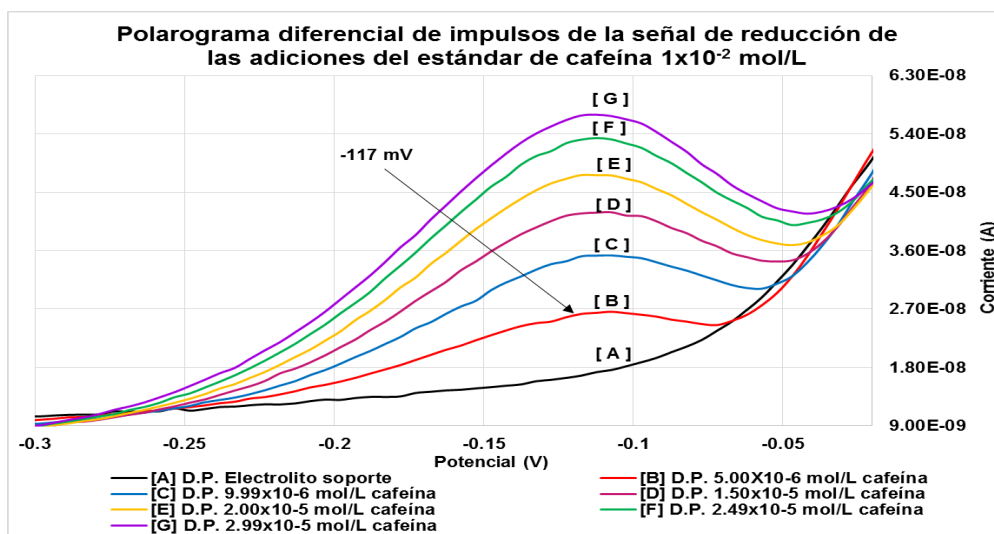


Figura 19.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de las adiciones del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L, en un electrolito soporte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El barrido se realizó en el sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo fue desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido fue de 3.4 mV/s, la amplitud del pulso de -50 mV y por un tiempo del pulso de 80 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4.

En la figura 19, se muestra el incremento de la intensidad de corriente de pico en el potencial -117 mV debido a adiciones de un estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L. La altura de pico fue utilizada para determinar el LDD y el LDC; los resultados se muestran en la figura 20.

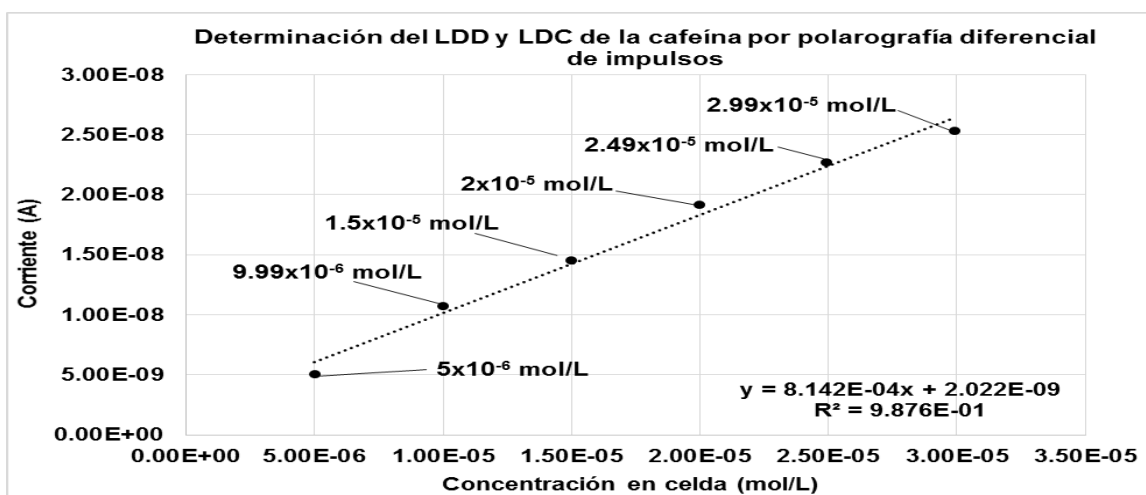


Figura 20.- Determinación del LDD y LDC del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L en el potencial -117 mV. Los datos de esta curva provienen del polarograma de la figura 19.

Resultado de esta gráfica, se obtiene la ecuación 15

$$Y = 8.142 \times 10^{-4} X + 2.022 \times 10^{-9}$$

Ecuación 15.- Ecuación de la recta obtenida al realizar el gráfico de adiciones patrón del estándar de cafeína.

Con los valores resultantes de la ecuación 15, se calcularon el LDD y LDC con base a lo reportado por Miller y Miller [39]. Las fórmulas utilizadas para el cálculo se encuentran en el anexo 9.2.1. Obteniendo los resultados de la tabla 7

Tabla 7.- LDD y LDC obtenidos para la cafeína

Potencial (mV)	LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
-117	$3.75 \times 10^{-6}$	0.73	$1.25 \times 10^{-5}$	2.43

Con los datos de la tabla 7 se aprecia que con estas condiciones y mediante la polarografía diferencial de impulsos, se logra la determinación de cafeína desde menos de 1 ppm y cuantificar desde menos de 3 ppm.

En la sección 5.4. se procedió a determinar el porcentaje de cafeína de una muestra de granos de cacao provenientes de la región de Tabasco.

El comportamiento de la teobromina y cafeína es similar; ambas presentan potenciales de pico similares, por lo cual no es posible su determinación simultánea y se requiere un proceso de separación.

### **5.3 Determinación del % de teobromina y cafeína extraídos mediante extracciones sucesivas con cloroformo.**

Como es posible notar en la sección 5.2, los analitos teobromina y cafeína registran una corriente de pico en potenciales cercanos entre sí, -127 mV en el caso de la teobromina y -117 mV en el caso de la cafeína. Para asegurar la menor interferencia entre ambos, se planteó la separación de ambos analitos mediante extracciones sucesivas; se procedió a utilizar cloroformo como disolvente debido a la alta solubilidad reportada para la cafeína en este disolvente; por su parte la teobromina

es reportada como prácticamente insoluble en el mismo. Sin embargo, dada la similitud de la estructura de ambos analitos, resulta sorprendente que haya una diferencia tan notoria en la afinidad con cloroformo, por lo que se procedió a calcular la constante de reparto de cada analito entre agua y cloroformo.

La cuantificación del analito (teobromina o cafeína) se realizó por polarografía diferencial de impulsos (en las condiciones presentadas anteriormente) y las constantes de reparto se calcularon a partir de las ecuaciones 16 y 17.

Este trabajo previo es requerido para poder cuantificar el contenido de teobromina y de cafeína en el extracto de granos de cacao.

Ecuación 16.- Coeficiente de partición

$$p = \left( \frac{\text{mol Fase organica}}{\text{mol Totales}} \right) = \frac{D * \frac{V_{org}}{V_{ac}}}{D * \frac{V_{org}}{V_{ac}} + 1}$$

Ecuación 17.- Constante de reparto a partir de la ecuación del coeficiente de partición  $p$

$$D = \frac{p}{\frac{V_{org}}{V_{ac}} - p \frac{V_{org}}{V_{ac}}}$$

Cuando se realizan extracciones sucesivas se tiene que:

$$q^n = 1 - p^n$$

### 5.3.1 Constante de reparto de la teobromina en cloroformo

Para determinar su constante de reparto, se preparó una disolución de teobromina con una concentración de  $1.47 \times 10^{-3}$  mol/L; una alícuota de 50.0 mL de esta disolución se sometió a 4 extracciones sucesivas con 10.0 mL de cloroformo cada una. Posteriormente se determinó la teobromina presente en la fase acuosa.

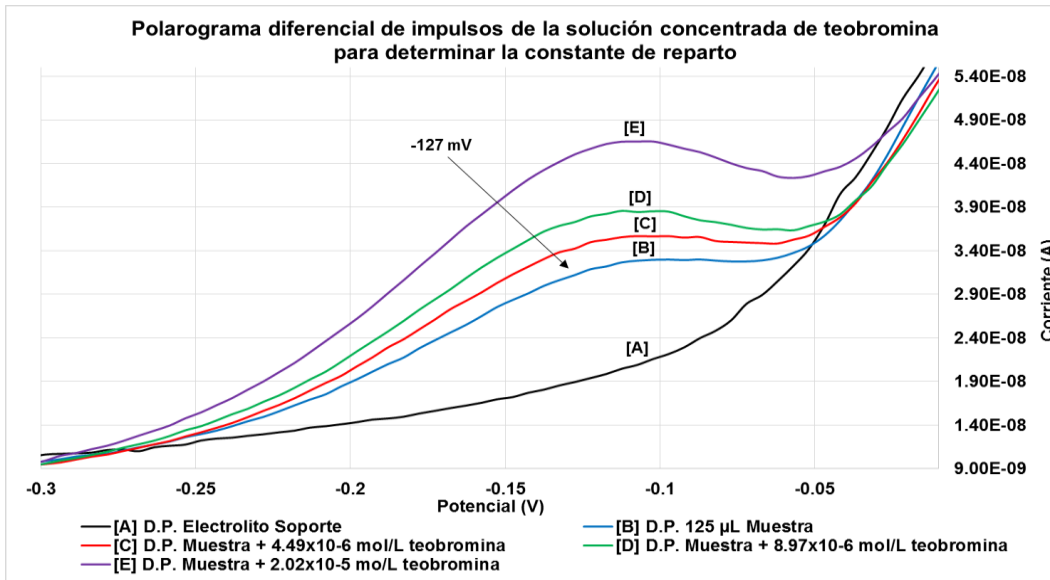


Figura 21.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de las 4 extracciones con cloroformo realizadas a la fase acuosa de la disolución sintética de teobromina  $1.47 \times 10^{-3}$  mol/L. Se adicionaron 10.0 mL del electrolito soporte  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, posteriormente se adicionaron 125  $\mu$ L de muestra; el sentido del barrido fue de positivos a negativos, el intervalo de trabajo fue desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido fue de 3.4 mV/s, la amplitud del pulso de -50 mV y el tiempo del pulso de 80 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4. La teobromina mostrada en la leyenda de la gráfica se refiere a la concentración de teobromina en celda.

Se utilizaron las intensidades de corriente de pico en el potencial de -127 mV para determinar la concentración de la teobromina en la muestra, los resultados se muestran en la figura 22:

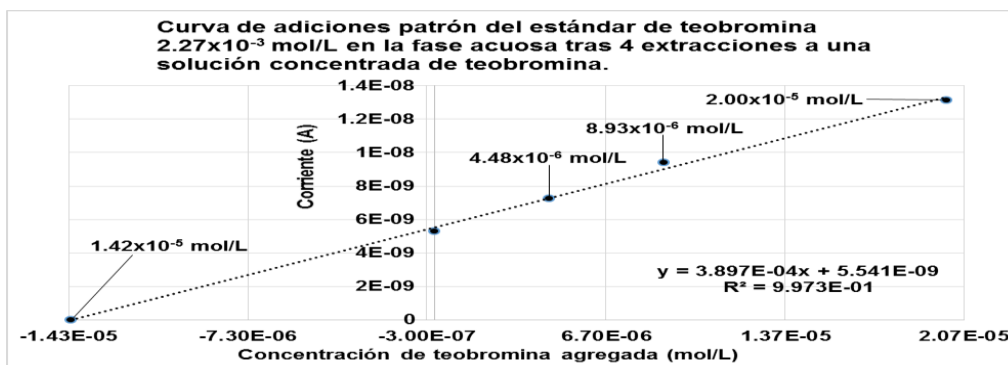


Figura 22.- Curva de adiciones patrón del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L. Nota: el punto  $-1.422 \times 10^{-5}$  mol/L es la extrapolación en la ecuación de la recta para obtener la concentración del analito en la celda.

Con esta curva se obtuvo la ecuación 18:

$$Y = 3.897 \times 10^{-4} X + 5.541 \times 10^{-9}$$

Ecuación 18.- Ecuación de la recta obtenida de la curva de adiciones patrón de la figura 22.

Con esta ecuación se determinó la concentración en celda:

$$\left| \frac{-5.541 \times 10^{-9}}{3.897 \times 10^{-4}} \right| = 1.42 \times 10^{-5} \text{ mol/L teobromina en celda}$$

A partir de este valor de concentración se determinaron los moles y el porcentaje de teobromina en la fase acuosa:

$$\left( \frac{1.42 \times 10^{-5} \text{ mol teobromina}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{10.125 \text{ mL celda}}{0.125 \text{ mL alicuota}} \right) (50 \text{ mL fase acuosa})$$

$$= 5.76 \times 10^{-5} \text{ mol de teobromina en la fase acuosa}$$

$$\% \text{ Fase acuosa} = \left( \frac{5.76 \times 10^{-5} \text{ mol teobromina fase acuosa}}{7.3819 \times 10^{-5} \text{ mol totales teobromina}} \right) * 100 = 78.01\%$$

A partir de estos datos se determinaron los moles y su porcentaje en la fase orgánica

$$\therefore 1.62 \times 10^{-5} \text{ mol de teobromina en la fase orgánica}$$

$$\% \text{ Fase orgánica} = \left( \frac{1.62 \times 10^{-5} \text{ mol teobromina fase orgánica}}{7.3819 \times 10^{-5} \text{ mol totales teobromina}} \right) * 100 = 21.99\%$$

Tabla 8.- Porcentaje de teobromina en la fase acuosa y orgánica tras someter una solución concentrada de teobromina a 4 extracciones sucesivas con cloroformo.

Fase	% de teobromina
Acuosa	78.01
Orgánica	21.99

Con los datos obtenidos se procedió a determinar la constante de reparto utilizando las ecuaciones 16 y 17:

$$q^4 = 0.7801 \therefore q = \sqrt[4]{0.7801} = 0.9398$$

Por lo cual el valor de  $p$  es:

$$p = 1 - 0.9398 = 0.0602$$

$$D = \frac{0.0602}{\frac{10 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} - 0.0602 * \frac{10 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}} = 0.3203$$

Se determinó una constante de reparto para la teobromina de 0.32.

### 5.3.2 Constante de reparto de la cafeína en cloroformo.

Para el caso de la cafeína se aplicó el mismo procedimiento que con la teobromina, se elaboró una disolución de cafeína con una concentración de  $1.45 \times 10^{-3}$  mol/L; una alícuota de 50.0 mL de esta disolución se sometió a 4 extracciones, se tomó la fase orgánica y se le retiró el cloroformo, finalmente se reconstituyó en fase acuosa con un aforo de 50.0 mL, las mediciones polarográficas se realizaron con esta disolución acuosa.

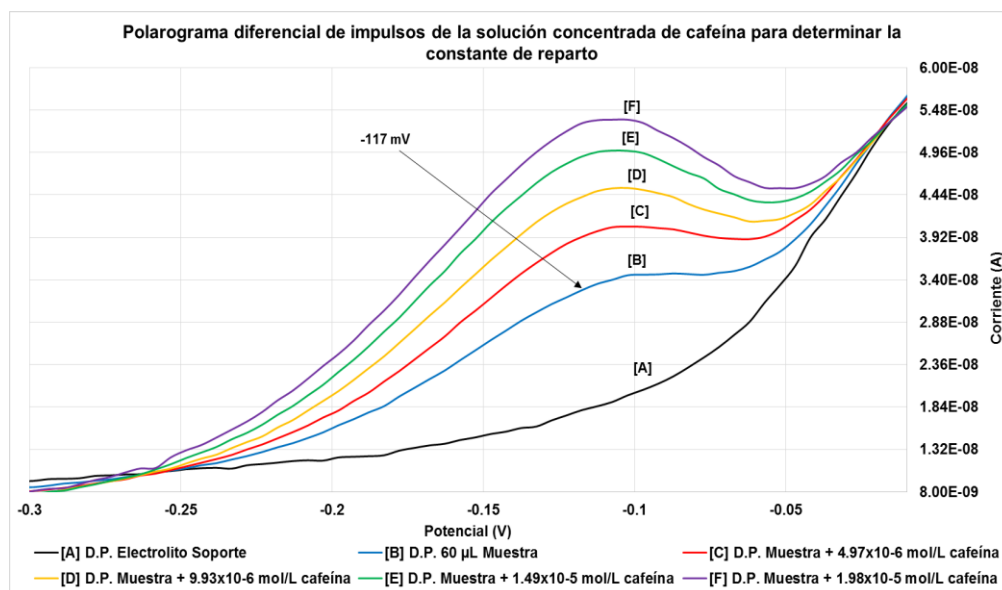


Figura 23.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de la disolución acuosa proveniente de las 4 extracciones realizadas a la disolución de cafeína  $1.45 \times 10^{-3}$  mol/L. El electrolito soporte utilizado fue 10.0 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L y se adicionaron 60  $\mu\text{L}$  de muestra, el barrido se realizó en el sentido de positivo a negativo, el intervalo de trabajo utilizado fue desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido fue de 3.4 mV/s, la amplitud del pulso de -50 mV y el tiempo del pulso de 80 ms, el tamaño de gota empleado fue de 4. La cafeína mostrada en la leyenda de la gráfica se refiere a la concentración de cafeína en celda.

Con los datos del polarograma de la figura 23 se elaboró la curva de adiciones patrón de la figura 24.

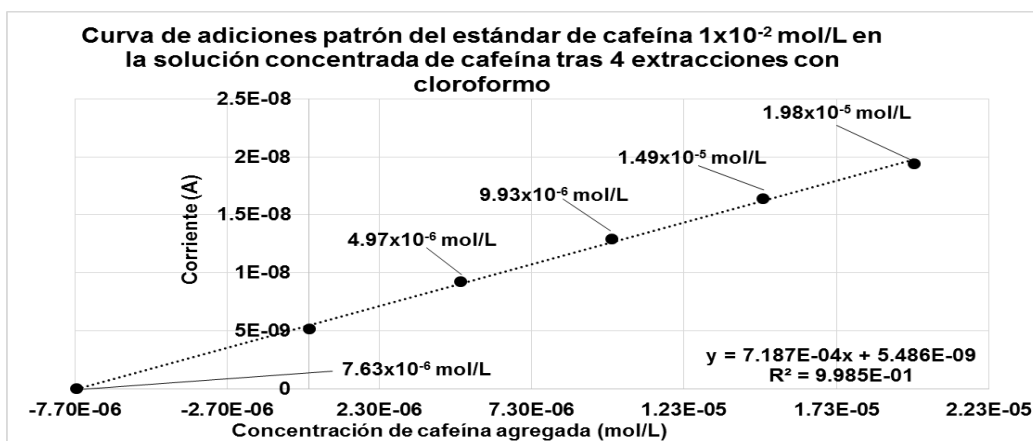


Figura 24.- Curva de adiciones patrón del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L realizadas a una muestra concentrada de cafeína. Nota: el punto  $-7.63 \times 10^{-6}$  mol/L es la extrapolación en la ecuación de la recta para obtener la concentración del analito en la celda.

Con esta curva se obtuvo la ecuación 19:

$$Y = 7.187 \times 10^{-4} X + 5.486 \times 10^{-9}$$

Ecuación 19.- Ecuación de la recta obtenida de la curva de adiciones patrón del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L.

La concentración en celda se determinó a partir de la ecuación 19:

$$\left| \frac{-5.486 \times 10^{-9}}{7.187 \times 10^{-4}} \right| = 7.63 \times 10^{-6} \text{ mol/L cafeína en celda}$$

Con esta concentración se determinaron los moles y el porcentaje de cafeína en la fase orgánica de las extracciones:

$$\left( \frac{7.63 \times 10^{-6} \text{ mol cafeína}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{10.060 \text{ mL celda}}{0.060 \text{ mL alicuota}} \right) (50 \text{ mL fase orgánica})$$

$$= 6.40 \times 10^{-5} \text{ mol de cafeína en la fase orgánica}$$

$$\% \text{ Fase orgánica} = \left( \frac{6.40 \times 10^{-5} \text{ mol cafeína fase orgánica}}{7.2600 \times 10^{-5} \text{ mol totales cafeína}} \right) * 100 = 88\%$$



Por lo cual en la fase acuosa se determinaron:

$$\therefore 8.61 \times 10^{-6} \text{ mol de cafeína en la fase acuosa}$$

$$\% \text{ Fase acuosa} = \left( \frac{8.61 \times 10^{-6} \text{ mol cafeína fase acuosa}}{7.2600 \times 10^{-5} \text{ mol totales cafeína}} \right) * 100 = 12\%$$

Tabla 9.- Porcentaje de cafeína en la fase orgánica y acuosa tras someter una solución concentrada de cafeína a 4 extracciones con cloroformo.

Fase	% de cafeína
Acuosa	12
Orgánica	88

Con lo cual se procedió a determinar la constante de reparto utilizando las ecuaciones 16 y 17:

$$q^4 = 0.12 \therefore q = \sqrt[4]{0.12} = 0.5886$$

Por lo cual el valor de p es:

$$p = 1 - q = 1 - 0.5886 = 0.4114$$

$$D = \frac{0.4114}{\frac{10 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} - 0.4114 * \frac{10 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}} = 3.4947$$

Obteniendo una constante de reparto de 3.5.

Tabla 10.- Cuadro comparativo de las constantes de reparto promedio obtenidas para la teobromina y la cafeína.

Analito	Constante de reparto promedio
Teobromina	0.32
Cafeína	3.50

Con estas constantes de reparto se observa que hay una mayor selectividad para la cafeína; sin embargo, al estar presentes ambos compuestos en la disolución se tendrá un pequeño porcentaje de teobromina en la fase orgánica, por lo cual se debe hacer un ajuste a la concentración del analito que se determine en fase

orgánica pues no se cuantificara solo cafeína sino una mezcla de cafeína y teobromina.

Así pues, con base en estos coeficientes de reparto, puede deducirse que al realizar un proceso de extracción de la fase acuosa con cloroformo como el descrito anteriormente (50.0 mL de extracto acuoso con cuatro extracciones de 10.0 mL de cloroformo), se tendrá finalmente:

En la fase acuosa: 78 % del total de teobromina y el 12 % del total de cafeína.

En la fase orgánica: 22 % del total de teobromina y el 88 % del total de cafeína.

Estos porcentajes han de permitir corregir los valores obtenidos directamente por las determinaciones de los analitos por polarografía.

## 5.4 Determinación de teobromina y cafeína en un extracto natural procedente de granos de cacao de la región de Tabasco.

### Teobromina en el extracto de granos de cacao.

En la figura 25, se observa una señal en el potencial de pico de  $-132\text{ mV}$ , por lo cual se realizaron adiciones de un estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ , obteniendo los siguientes datos:

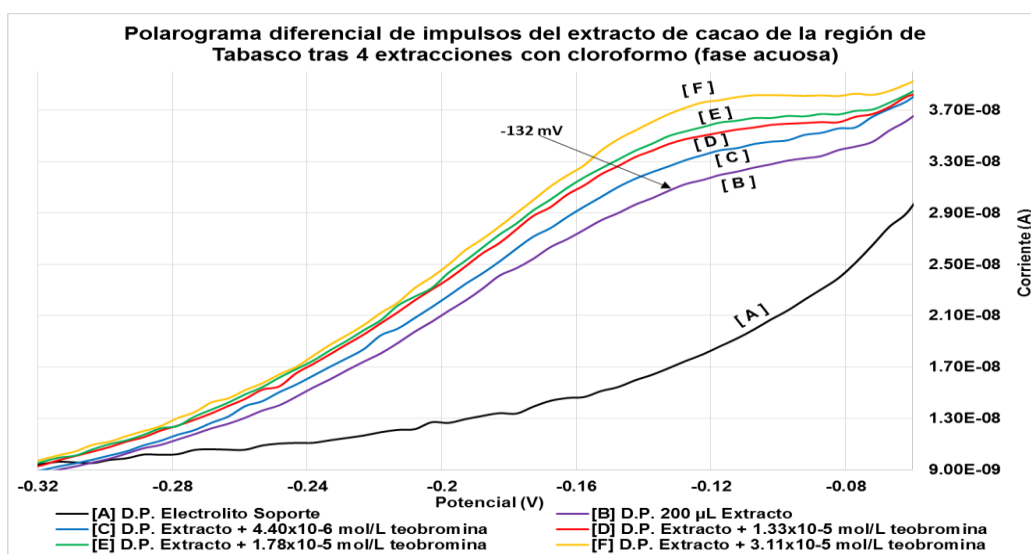


Figura 25.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de las 4 extracciones realizadas a la fase acuosa del extracto obtenido de granos de cacao de la región de Tabasco. El electrolito soporte utilizado fue  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{ }0.5\text{ mol/L}$  y se adicionaron  $250\text{ }\mu\text{L}$  de muestra, el barrido utilizado fue en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo utilizado fue desde  $200\text{ mV}$  hasta  $-750\text{ mV}$ , la velocidad de barrido fue de  $3.4\text{ mV/s}$ , la amplitud del pulso de  $-50\text{ mV}$  y el tiempo del pulso de  $80\text{ ms}$ , el tamaño de gota utilizado fue de 4. La teobromina mostrada en la leyenda de la gráfica se refiere a la concentración de teobromina en celda.

Se tiene un potencial de pico en  $-132\text{ mV}$ . En la gráfica de la figura 26 se presentan los resultados obtenidos para la determinación de teobromina por adiciones patrón.

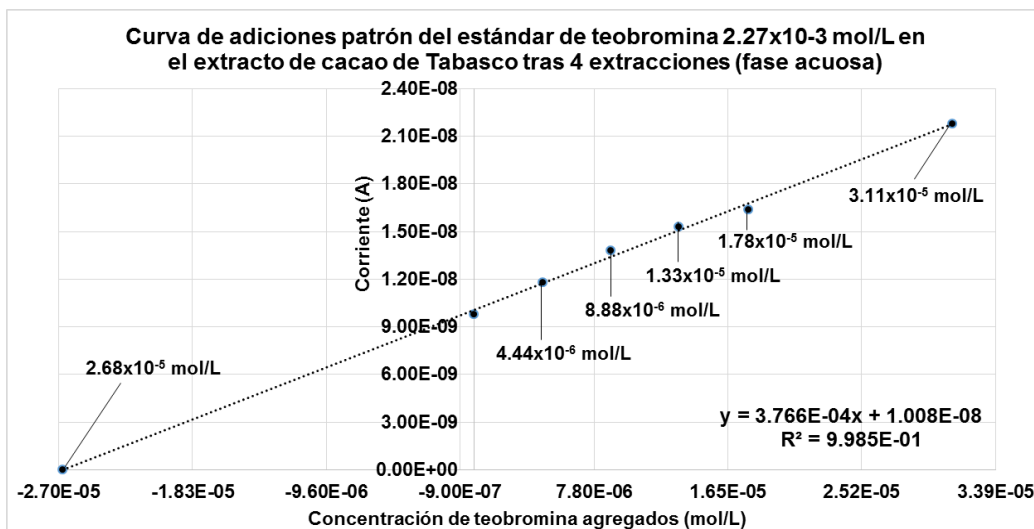


Figura 26.- Curva de adiciones patrón del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L en la fase acuosa después de 4 extracciones realizadas al extracto obtenido de granos de cacao de la región de Tabasco, el electrolito soporte utilizado fue  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L. Nota: el punto  $2.68 \times 10^{-5}$  mol/L es la extrapolación en la ecuación de la recta para obtener la concentración del analito en la celda.

$$Y = 3.767 \times 10^{-4} X + 1.008 \times 10^{-8}$$

Ecuación 20.- Ecuación de la recta obtenida al realizar la curva de adiciones patrón del estándar de teobromina en el extracto de cacao de la región de Tabasco.

Con esta ecuación se obtiene:

$$\left| \frac{-1.008 \times 10^{-8}}{3.767 \times 10^{-4}} \right| = 2.68 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ teobromina en celda.}$$

Se realiza una corrección debido a que se tiene un 12% de cafeína presente en la fase acuosa y la determinación incluye a ambos analitos:

$$\left( 2.68 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ totales} * 0.87 \right) = 2.33 \times 10^{-5} \text{ mol/L teobromina en celda}$$

Con este dato podemos obtener la concentración en el extracto:

$$\left( \frac{2.33 \times 10^{-5} \text{ mol teobromina}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{10.2 \text{ mL celda}}{0.2 \text{ mL alicuota}} \right) \left( \frac{10 \text{ mL aforo}}{1 \text{ mL alicuota}} \right) (50 \text{ mL extracto})$$

$$= 5.95 \times 10^{-4} \text{ mol de teobromina en el extracto}$$

También se realiza un ajuste debido a que en celda no se tiene presente el 100% de la teobromina extraída inicialmente del cacao, por lo que se obtiene:

$$\frac{\left(5.95 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ teobromina} * 100 \%\right)}{78 \%} = 7.62 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ teobromina en el extracto}$$

Así en la muestra se obtiene:

$$\left(\frac{7.62 \times 10^{-4} \text{ mol de teobromina}}{10.5999 \text{ g cacao}}\right) \left(\frac{180.17 \text{ g teobromina}}{1 \text{ mol teobromina}}\right) (100)$$

$$= 1.29 \text{ g de teobromina} / 100 \text{ g de cacao base humeda}$$

Para poder comparar con los valores reportados en la literatura, se calcula el porcentaje en base seca:

$$\left(\frac{1.29 \text{ g de teobromina}}{100 \text{ g cacao humedo}}\right) \left(\frac{100 \text{ g cacao humedo}}{96.5 \text{ g cacao seco}}\right) (100)$$

$$= 1.34 \text{ g de teobromina} / 100 \text{ g de cacao base seca}$$

Por lo tanto se obtuvieron 1.34 g de teobromina por cada 100 g de cacao base seca.

Mediante el uso de la técnica de polarografía diferencial de impulsos se puede determinar a partir de 1.2 ppm de teobromina en celda; sumado a ello, es posible la determinación de la teobromina en una muestra de granos de cacao como se muestra en las figuras 25 y 26, por lo cual se aprecia la utilidad del método analítico para una rápida determinación de este analito en una muestra natural.

Se determinó así un porcentaje de teobromina en la muestra de (1.34 g teobromina/100 g de cacao), el cual se encuentra en el intervalo de valores reportados en la bibliografía (0.8 – 1.3 g de teobromina/100 g de cacao base seca) [26,27].

Debe resaltarse la importancia de la corrección por la cantidad de cafeína presente en la fase acuosa (12%) y la corrección debido a la teobromina que se extrae en la fase orgánica después de las extracciones (22%), pues no se cuantifica de forma directa el total de la concentración del analito presente originalmente en la muestra.

## Cafeína en el extracto de granos de cacao

En la figura 27, es posible observar el polarograma resultante de las 4 extracciones a las cuales fue sometido el extracto proveniente de granos de cacao de la región de tabasco, así como las adiciones de un estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L, la fase analizada fue la fase orgánica de las extracciones reconstituida en una disolución acuosa.

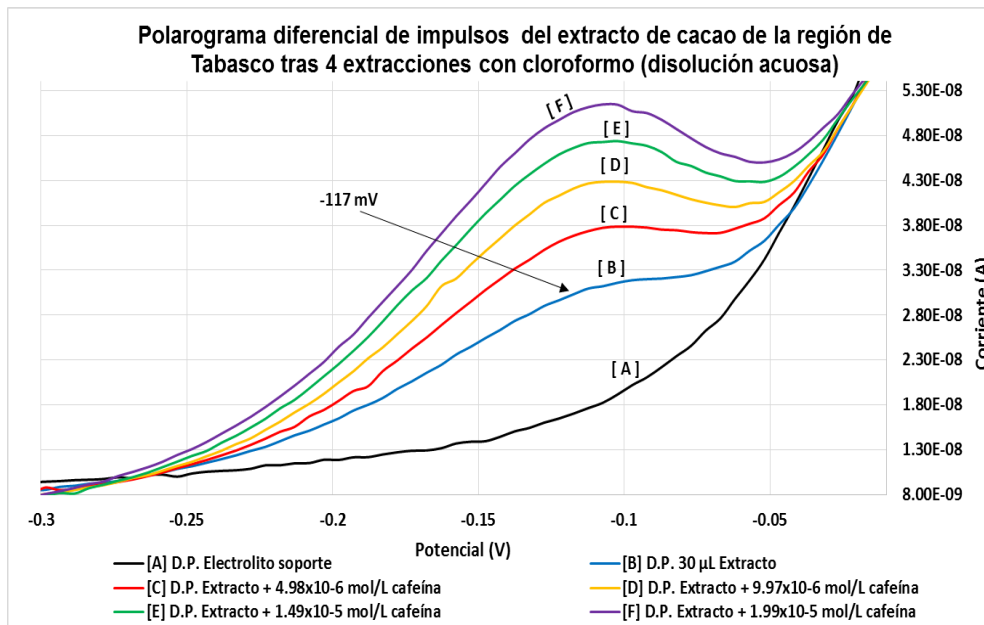


Figura 27.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de las 4 extracciones realizadas al extracto obtenido de granos de cacao de la región de Tabasco, la fase analizada es la fase orgánica de las extracciones reconstituida en una disolución acuosa. El electrolito soporte utilizado fue  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L y se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de la muestra, el barrido se empleó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo utilizado abarca desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido fue de 3.4 mV/s, la amplitud del pulso de -50 mV y el tiempo del pulso de 80 ms, se trabajó con un tamaño de gota de 4. La cafeína mostrada en la leyenda de la gráfica se refiere a la concentración de cafeína en celda.

A partir de los datos obtenidos del polarograma de la figura 27, se elaboró una curva de adiciones patrón la cual se muestra en la figura 28.

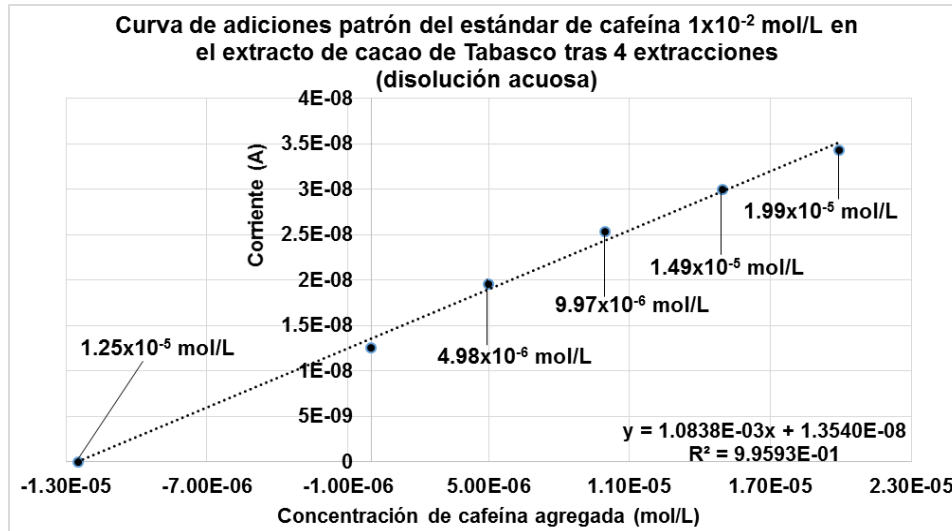


Figura 28.- Curva de adiciones patrón del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L en la disolución acuosa proveniente de la fase orgánica de las extracciones realizadas al extracto de cacao de la región de Tabasco. Nota: el punto  $-1.25 \times 10^{-5}$  mol/L es la extrapolación en la ecuación de la recta para obtener la concentración del analito en la celda.

Con esta curva se obtuvo la ecuación 21.

$$Y = 1.084 \times 10^{-3} X + 1.354 \times 10^{-8}$$

Ecuación 21.- Ecuación de la recta obtenida de la curva de adiciones patrón de la figura 28.

Con la ecuación 21 se obtuvo:

$$\left| \frac{-1.354 \times 10^{-8}}{1.084 \times 10^{-3}} \right| = 1.25 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ cafeína en celda}$$

Se realiza una corrección debido a que se tiene un 22% de teobromina presente en la fase orgánica:

$$\left( 1.25 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ cafeína} * 0.80 \right) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L cafeína en celda}$$

Con este dato podemos obtener la concentración en el extracto:

$$\left( \frac{1 \times 10^{-5} \text{ mol cafeína}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{10.03 \text{ mL celda}}{0.03 \text{ mL alicuota}} \right) (25 \text{ mL extracto})$$

$$= 8.36 \times 10^{-5} \text{ mol de cafeína en el extracto}$$

También se realiza otra corrección debido a que en celda no se tiene presente el 100% de la cafeína extraída inicialmente del cacao, obteniendo:

$$\frac{\left(8.36 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ cafeína} * 100 \%\right)}{88 \ \%} = 9.5 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ cafeína en el extracto}$$

Así en la muestra se obtiene:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{9.5 \times 10^{-5} \text{ mol de cafeína}}{10.5999 \text{ g cacao}} \right) \left( \frac{194.19 \text{ g cafeína}}{1 \text{ mol cafeína}} \right) (100) \\ & = 0.174 \text{ g de cafeína} / 100 \text{ g de cacao base humeda} \end{aligned}$$

Para poder comparar con los valores reportados en la literatura, se calcula el porcentaje en base seca:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{0.174 \text{ g de cafeína}}{100 \text{ g cacao humedo}} \right) \left( \frac{100 \text{ g cacao humedo}}{96.5 \text{ g cacao seco}} \right) (100) \\ & = 0.18 \text{ g de cafeína} / 100 \text{ g de cacao base seca} \end{aligned}$$

Por lo tanto se determinaron 0.18 g de cafeína por cada 100 g de cacao base seca.

La polarografía diferencial de impulsos permite determinar a partir de 2.43 ppm de cafeína, mediante el uso de esta técnica se determinó un porcentaje de cafeína en la muestra de 0.18 g de cafeína/100 g de cacao, el cual se encuentra dentro del intervalo de valores reportados en la bibliografía (0.1–0.7 g de cafeína/100 g de cacao base seca) [26,27].

Es posible observar la utilidad del método analítico para la determinación de este analito en una muestra de granos de cacao dada la rapidez y sensibilidad del método.



## 5.5 Determinación de azúcares reductores y sacarosa invertida en un extracto natural procedente de granos de cacao de la región de Tabasco.

Se realizó la determinación de azúcares reductores mediante su determinación potenciométrica; las curvas de valoración que se obtuvieron se presentan a continuación:

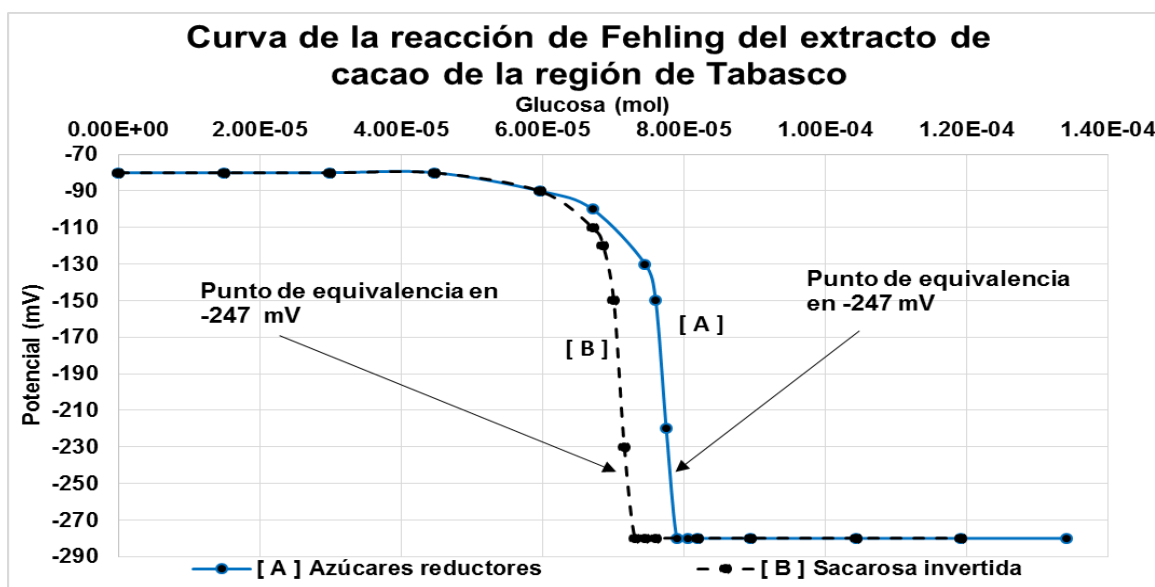
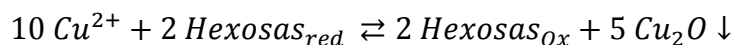


Figura 29.- Curva de la reacción de Fehling, determinada potenciométrica por retroceso mediante la adición de glucosa  $1.575 \times 10^{-2}$  mol/L para azúcares reductores totales y sacarosa invertida. En el caso de la curva para la determinación de sacarosa invertida se hizo una corrección de 30 mV debido a un desplazamiento del potencial generado por la hidrólisis de la muestra.

En la Figura 29, en la curva [A], es posible observar la cantidad de glucosa que reacciona con el cobre que se encuentra en exceso después de que este haya reaccionado con los azúcares reductores de la muestra; se conoce que la reacción entre la glucosa (una Hexosa reductora) y el  $\text{Cu}^{2+}$  tiene una relación de 10 cobres por 2 Hexosas, o lo que es lo mismo, una relación 5:1, y que el punto de equivalencia se encuentra a 5/6 del salto de potencial <sup>[38]</sup>.



Por lo cual se obtuvo el potencial a 5/6 de la curva el cual es de -247 mV, en este potencial han reaccionado  $8.26 \times 10^{-5}$  mol de glucosa.

Se calcularon los moles totales de cobre adicionados a la celda

$$\left(\frac{2.29 \times 10^{-1} \text{ mol CuSO}_4}{1000 \text{ mL}}\right) (2 \text{ mL}) = 4.59 \times 10^{-4} \text{ mol Cu}^{2+} \text{ en celda}$$

Con los datos obtenidos de la curva de la figura 29, se determinaron los moles de cobre en exceso, los cuales reaccionaron con la glucosa adicionada durante la titulación de la muestra:

$$(8.26 \times 10^{-5} \text{ mol glucosa}) \left(\frac{5 \text{ mol cobre}}{1 \text{ mol glucosa}}\right) = 4.13 \times 10^{-4} \text{ mol de Cu}^{2+} \text{ en exceso}$$

Con este dato se obtuvieron los moles de cobre que reaccionaron con los azúcares reductores procedentes de la muestra:

$$\begin{aligned} & (4.59 \times 10^{-4} \text{ mol Cu}^{2+} \text{ en celda}) - (4.13 \times 10^{-4} \text{ mol exceso}) \\ & = 4.58 \times 10^{-5} \text{ mol Cu}^{2+} \text{ reaccionaron con azúcares de la muestra} \end{aligned}$$

Por lo cual la muestra contenía:

$$\begin{aligned} & (4.58 \times 10^{-5} \text{ mol Cu}^{2+}) \left(\frac{1 \text{ mol glucosa}}{5 \text{ mol Cu}}\right) \left(\frac{50 \text{ mL extracto}}{1 \text{ mL alicuota}}\right) \left(\frac{180.16 \text{ g glucosa}}{1 \text{ mol glucosa}}\right) \left(\frac{100}{10.1971 \text{ g cacao}}\right) \\ & = 0.81 \text{ g glucosa/100 g de semillas de cacao base humeda} \end{aligned}$$

Sin embargo, se realiza una corrección debido a que los valores encontrados en la bibliografía están reportados en base seca:

$$\begin{aligned} & \left(\frac{0.81 \text{ g de glucosa}}{100 \text{ g cacao humedo}}\right) \left(\frac{100 \text{ g cacao humedo}}{96.5 \text{ g cacao seco}}\right) (100) \\ & = 0.84 \text{ g de glucosa /100 g de cacao base seca.} \end{aligned}$$

Por lo tanto se determinaron 0.84 g de azúcares reductores por cada 100 g de cacao base seca.

El porcentaje de azúcares reductores obtenido es de 0.84 g de glucosa/ 100g de cacao base seca, el cual se encuentra dentro del intervalo de valores reportados en la bibliografía (0.36 a 1.07 g de azúcares reductores/100 g de cacao base seca) <sup>[40]</sup>.

Se logra apreciar la utilidad del método analítico para una rápida determinación de este analito en una muestra natural.

Además, se realizó la hidrólisis de la sacarosa para determinar la cantidad de la misma por medio de la reacción de Fehling. Se realizó el mismo procedimiento de

cálculo que para azúcares reductores; sin embargo, en esta determinación se tiene la suma de sacarosa invertida y los azúcares reductores propios de la muestra, por lo que a este resultado se le restó la glucosa previamente determinada.

$$1.39 \text{ g glucosa} - 0.81 \text{ g glucosa de azúcares reductores}$$

$$= 0.58 \text{ g glucosa /100 g de semillas de cacao}$$

Con este dato se calculó la sacarosa proveniente de la muestra, teniendo en cuenta que 1 mol de sacarosa se hidroliza en 2 moles de hexosas reductores que se muestra como 2 mol de glucosa.

$$(0.58 \text{ g glucosa}) \left( \frac{1 \text{ mol glucosa}}{180.16 \text{ g glucosa}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol sacarosa}}{2 \text{ mol glucosa}} \right) \left( \frac{342.30 \text{ g sacarosa}}{1 \text{ mol sacarosa}} \right)$$

$$= 0.55 \text{ g sacarosa /100 g de semillas de cacao base húmeda.}$$

Sin embargo, se realizó un ajuste debido a que el resultado obtenido es en base húmeda y los valores encontrados en la literatura reportan los resultados en base seca:

$$\left( \frac{0.55 \text{ g de sacarosa}}{100 \text{ g cacao húmedo}} \right) \left( \frac{100 \text{ g cacao húmedo}}{96.5 \text{ g cacao seco}} \right) (100)$$

$$= 0.57 \text{ g de sacarosa /100 g de cacao base seca.}$$

Por lo tanto se determinaron 0.57 g de sacarosa por cada 100 g de cacao base seca.

Al comparar este valor obtenido con el valor reportado en la literatura que es de 0.61 a 3.06 g de sacarosa/100 g de cacao base seca <sup>[40]</sup>, se puede notar que la muestra analizada se encuentra levemente debajo del intervalo reportado, esto debido a que la sacarosa total disminuye durante el proceso de fermentación, mientras que los azúcares reductores por su parte aumentan, debido a la acción de la invertasa del cotiledón.

## 5.6 Análisis fundamental para la determinación de cationes.

El primer parámetro electroquímico que se estableció, fue el dominio de electroactividad del electrolito soporte  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  0.1 mol/L planteado para la determinación de los analitos de interés; para determinar el dominio de electroactividad se realizó un barrido de potencial desde -1300 hasta 500 mV, con una velocidad de barrido de 5 mV/s, en una celda electroquímica que contenía 10.0 mL de  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  0.1 mol/L. Como se muestra en la figura 30 el dominio de electroactividad para este medio es muy amplio y va desde -1200 mV aproximadamente hasta cerca de 400 mV.

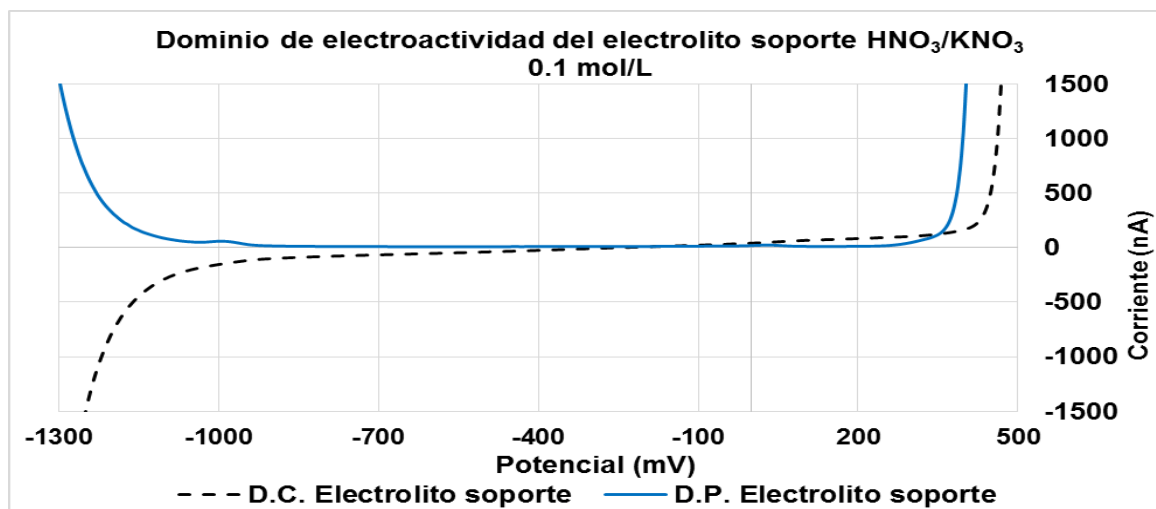


Figura 30.- Ejemplo de polarogramas clásico y diferencial de impulsos de la corriente residual del electrolito soporte  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  0.1 mol/L. Para el caso de polarografía clásica, el barrido se realizó en sentido positivo a negativo, la velocidad de barrido de 5 mV/s, el tamaño de gota utilizado fue de 9. Para el caso de polarografía diferencial de impulsos, el barrido se realizó en dirección positiva a negativa, velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms, se trabajó con un tamaño de gota de 9.

En la Figura 31 se puede observar el polarograma diferencial de impulsos de las adiciones de estándares de los metales pesados de interés, en un electrolito soporte  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  0.1 mol/L. Es posible observar una señal de potencial de pico en 22.4 mV debido a la adición del estándar de  $\text{Cu (II)}$   $6 \times 10^{-3}$  mol/L, una señal de potencial de pico en -997 mV debido a la adición del estándar de  $\text{Zn (II)}$   $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L, una señal de potencial de pico en -571 mV debido a la adición del

estándar de Cd (II)  $8.9 \times 10^{-5}$  mol/L y una señal de potencial de pico en -381 mV debido a la adición del estándar de Pb (II)  $1 \times 10^{-3}$  mol/L; en el caso del estándar de As(V)  $1.34 \times 10^{-3}$  mol/L las adiciones no mostraron señal en el electrolito soporte seleccionado .

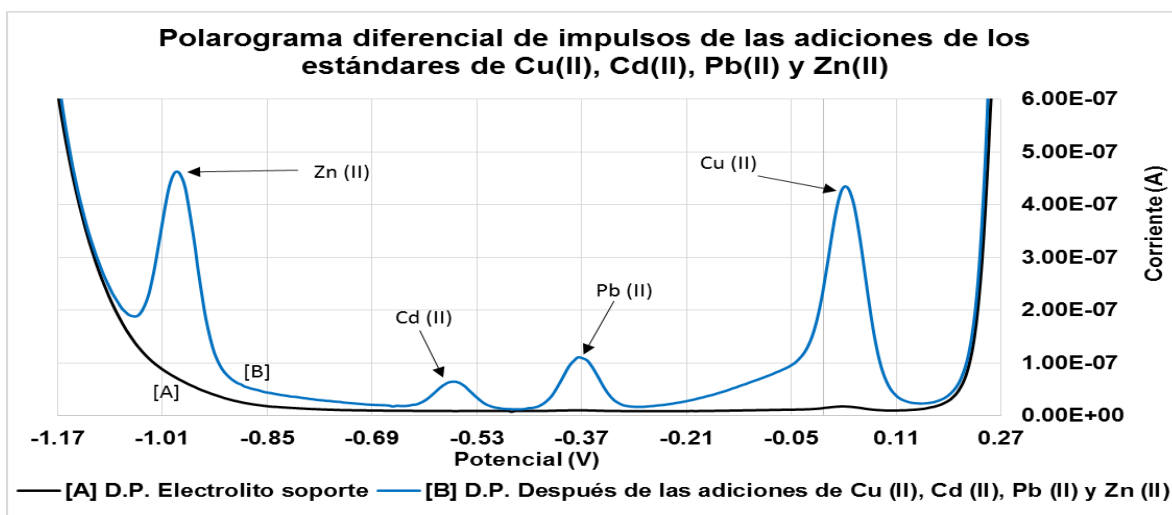


Figura 31.-Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado después de las adiciones de los estándares de Cu (II), Zn (II), Cd (II) y Pb (II). El barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo fue desde 264 mV hasta -1300 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms, el tamaño de gota empleado fue de 4.

A partir de la intensidad de corriente registrada en los potenciales que se aprecian en la figura 31, se procedió a calcular los LDD y LDC para cada catión.

A partir del polarograma que se presentan en la figura 32, se obtuvieron los datos de intensidad de corriente para cada valor de concentración de Cu(II) añadido, los cuales se presentan en la curva de adiciones patrón de la figura 33.

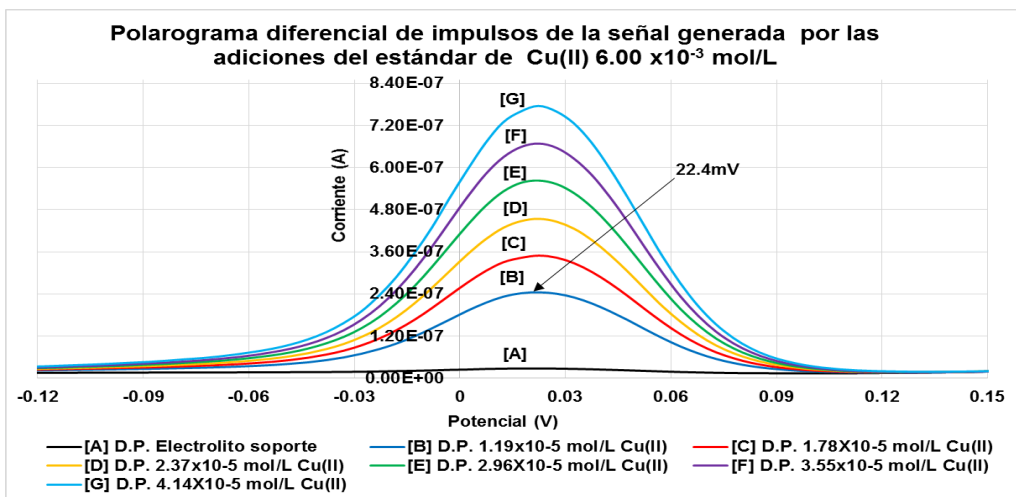


Figura 32.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado para la señal de las adiciones del estándar de cobre  $6 \times 10^{-3}$  mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El electrolito soporte utilizado fue  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  0.1 mol/L, el barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo abarco desde 264 mV hasta -1300 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms, se trabajó con un tamaño de gota de 4.

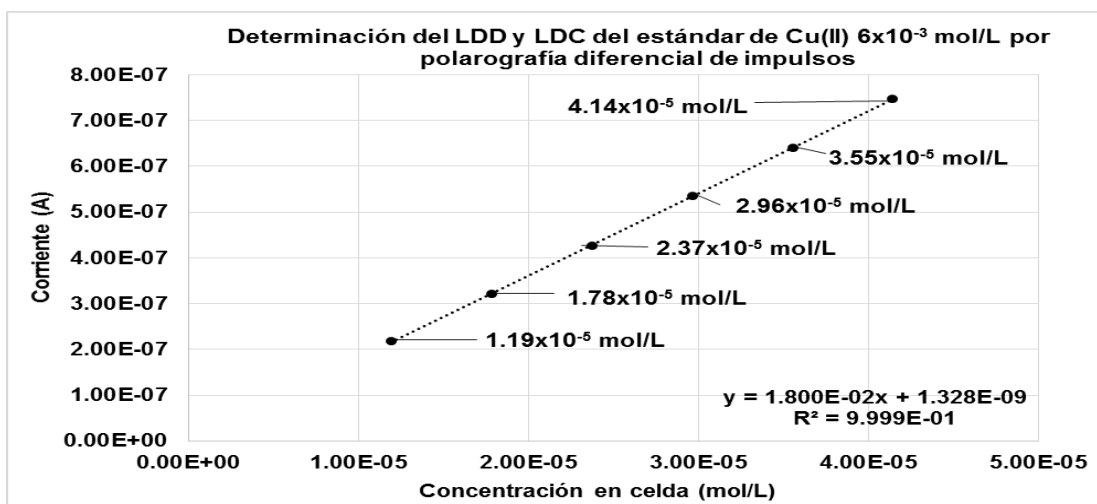


Figura 33.- Determinación del LDD y LDC del estándar de Cu(II)  $6 \times 10^{-3}$  mol/L en el potencial 22.4 mV, con base en la concentración presente en celda.

A partir de esta curva de calibración se obtienen la siguiente ecuación y coeficiente de correlación (ecuación 22):

$$Y = 1.800 \times 10^{-2} X + 1.328 \times 10^{-9} \quad R^2 = 0.9999 \quad n = 6$$

Tabla 11.- Resultados de la sustitución de datos experimentales de las adiciones del estándar de Cu(II)  $6 \times 10^{-3}$  mol/L en las fórmulas que se observan en la sección 9.2.1 de anexos.

S i/c	Sm	Sb	iLDD
$1.76 \times 10^{-9}$	$7.11 \times 10^{-5}$	$1.52 \times 10^{-9}$	$5.90 \times 10^{-9}$
LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
$2.54 \times 10^{-7}$	0.02	$8.46 \times 10^{-7}$	0.05

Para el caso de los demás cationes, los polarogramas y curvas obtenidas para el cálculo de sus respectivos LDD y LDC se encuentran en la sección 9.5 de anexos. Los LDD y LDC obtenidos para cada catión se pueden apreciar en la tabla 12.

Tabla 12.- LDD y LDC de los cationes utilizados como estándares.

Catión	Potencial (mV)	LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
Zn(II)	-997	$5.83 \times 10^{-7}$	0.04	$1.94 \times 10^{-6}$	0.13
Cd(II)	-571	$4.43 \times 10^{-7}$	0.05	$1.48 \times 10^{-6}$	0.17
Pb(II)	-381	$1.26 \times 10^{-7}$	0.03	$4.19 \times 10^{-7}$	0.09
Cu(II)	22.4	$2.54 \times 10^{-7}$	0.02	$8.46 \times 10^{-7}$	0.05

Conociendo estos LDD y LDC, se observa que es posible lograr una buena cuantificación en concentraciones por debajo de los límites estipulados en las normatividades existentes para metales en cacao [7,8,9,10,11,12,13].

## 5.7 Determinación de cationes en un extracto natural procedente de granos de cacao de la región de Tabasco

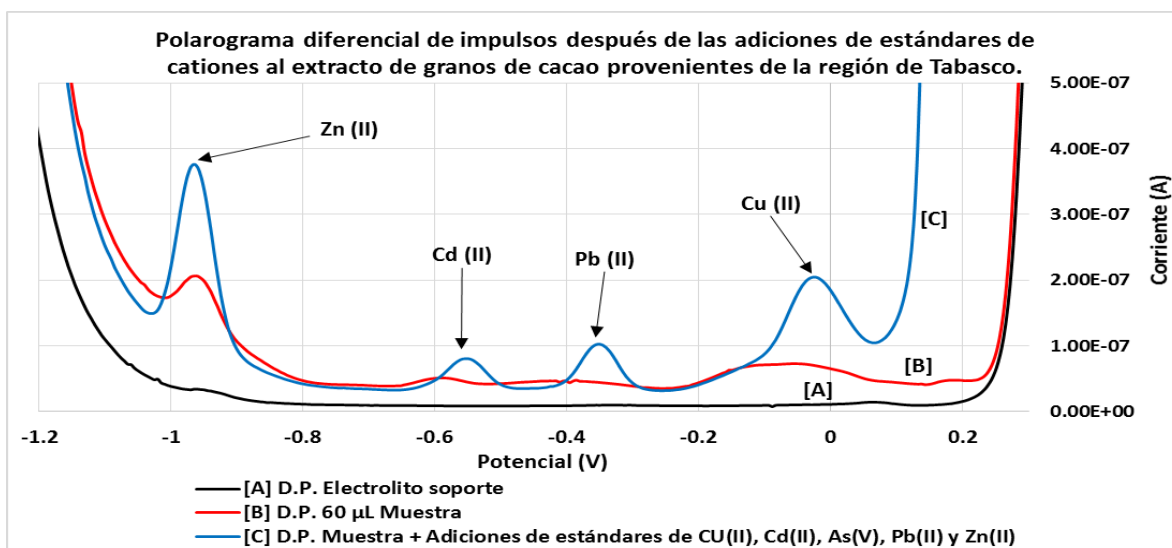


Figura 34.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado después de las adiciones de los estándares de los cationes a la muestra de cacao. El barrido fue realizado en dirección positiva a negativa, el intervalo de trabajo abarca desde 400 mV hasta -1300 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms, el tamaño de gota empleado fue de 4.

En la figura 34 se aprecian algunos picos de corriente generados por la adición de la muestra de cacao después del tratamiento de digestión ácida (sección 4.5). Al realizar adiciones de los estándares de Cu (II), Zn (II), Cd (II) y Pb (II), se apreció un aumento de la intensidad de corriente de pico en el potencial -960 mV, donde la muestra mostraba un pico de corriente, por lo cual se realizaron más adiciones del estándar de Zn(II), para la cuantificación de este metal en la muestra, lo cual se aprecia en la figura 35. En el caso de las adiciones de los demás estándares, no se mostró un aumento de corriente en los potenciales de los picos que se generaron con la adición de la muestra, por lo cual podemos estipular que la muestra analizada (granos de cacao procedentes de la región de Tabasco), no contiene los metales Cu (II), Cd (II) y Pb (II), o al menos no se encuentran en concentraciones que superen los respectivos límites de detección.



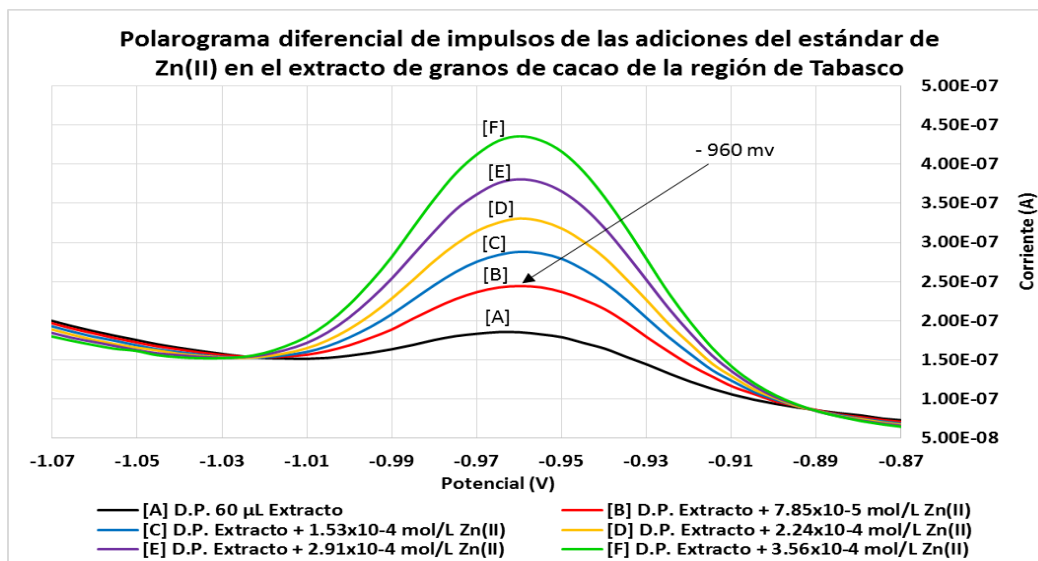


Figura 35.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de las adiciones del estándar de Zn (II)  $3.06 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  en la muestra de granos de cacao. El barrido se realizó en dirección positiva a negativa, el intervalo de trabajo abarca desde  $400 \text{ mV}$  hasta  $-1300 \text{ mV}$ , la velocidad de barrido de  $5 \text{ mV/s}$ , amplitud del pulso de  $-50 \text{ mV}$  y tiempo de pulso de  $40 \text{ ms}$ , se trabajó con un tamaño de gota de 4. El zinc mostrado en la leyenda de la gráfica se refiere a la concentración de zinc en celda.

A partir de los datos de intensidad de corriente obtenidos del polarograma de la figura 35, se elaboró la curva de adiciones patrón que se aprecia en la figura 36.

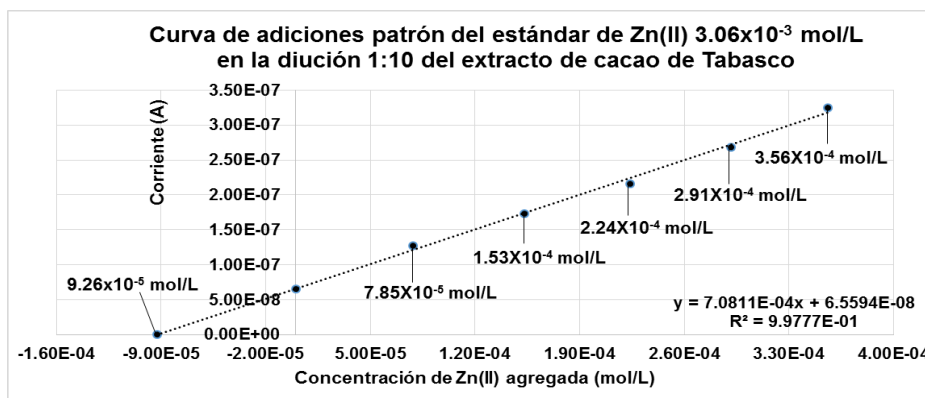


Figura 36.- Curva de adiciones patrón del estándar de zinc  $3.06 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  en la dilución 1:10 del extracto de cacao de la región de Tabasco. Nota: el punto  $-9.2633 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  es la extrapolación en la ecuación de la recta para obtener la concentración del analito en la celda.

Con esta curva se obtuvo la ecuación 23:

$$Y = 7.0811 \times 10^{-4} X + 6.5594 \times 10^{-8}$$

Ecuación 23.- Ecuación de la recta obtenida de la gráfica de adiciones patrón de la figura 36.

Con la ecuación 23 se obtuvo:

$$\left| \frac{-6.56 \times 10^{-8}}{7.08 \times 10^{-4}} \right| = 9.26 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ Zinc en celda.}$$

Con este dato podemos obtener la concentración en el extracto:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{9.26 \times 10^{-5} \text{ mol Zinc}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{10.06 \text{ mL celda}}{0.06 \text{ mL alicuota}} \right) \left( \frac{10}{1} \right) (5 \text{ mL extracto}) \\ & = 7.77 \times 10^{-4} \text{ mol de Zinc en el extracto.} \end{aligned}$$

Por lo cual la muestra contenía:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{7.77 \times 10^{-4} \text{ mol de Zinc}}{1.1964 \text{ g cacao}} \right) \left( \frac{65.38 \text{ g Zinc}}{1 \text{ mol Zinc}} \right) (100) \\ & = 4.24 \text{ g de Zinc / 100 g de cacao base humeda.} \end{aligned}$$

Sin embargo se realiza una corrección debido a que los valores encontrados en la bibliografía están reportados en base seca:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{4.24 \text{ g de Zinc}}{100 \text{ g cacao humedo}} \right) \left( \frac{100 \text{ g cacao humedo}}{96.5 \text{ g cacao seco}} \right) (100) \\ & = 4.39 \text{ g de Zinc / 100 g de cacao base seca.} \end{aligned}$$

Por lo tanto se determinaron 4.39 g de zinc por cada 100 g de cacao base seca.

Es posible observar que el porcentaje de zinc determinado en la muestra (4.39 g de zinc/100 g de cacao base seca), se encuentra dentro del intervalo encontrado en la bibliografía (2.4 – 5.1 g de zinc/ 100 g de cacao base seca)<sup>[41,42]</sup>. También es posible apreciar la utilidad del método analítico para una rápida determinación de este analito en una muestra natural.

## 6 Conclusiones

El cacao es un producto natural de gran importancia en la historia de Mesoamérica, usado como base de alimentos y golosinas, así como en medicina debido a sus componentes teobromina y cafeína; debido al efecto que generan al organismo estos compuestos, su cuantificación es de gran importancia.

Tabla 13.-Resultados generales del estudio de los granos de cacao procedentes de la región de Tabasco.

Analito	Concentración determinada en la muestra (g/100 g de cacao base seca)	Concentración reportada en la literatura (g/100 g de cacao base seca)	Concentración reportada en normas (g/100 g de cacao base seca)
Teobromina	1.34	0.8 - 1.3	–
Cafeína	0.18	0.1 - 0.7	–
Azúcares reductores	0.84	0.36 - 1.07	–
Sacarosa	0.57	0.61 - 3.06	–
Zn (II)	4.39	2.4 - 5.1	–
Cu (II)	< LDD	2.22	5
Cd (II)	< LDD	0.16	0.06
Pb (II)	< LDD	0.005 - 0.007	0.1
As (V)	< LDD	< 0.003	0.1

Para la teobromina, se determinó la presencia de una señal de reducción mediante polarografía clásica en un potencial de pico de -127 mV; también se determinó un LDC de  $6.45 \times 10^{-6}$  mol/L mediante polarografía diferencial de impulsos. Por medio del análisis logarítmico se determinó un potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) de -0.059 V; dada la pendiente obtenida de 0.0883, se determinó que el sistema no se comporta conforme a la ley de Nernst. Por su parte, se determinó la presencia de una señal de reducción para la cafeína en un potencial de pico de -117 mV; también se determinó un LDC de  $1.25 \times 10^{-5}$  mol/L mediante polarografía diferencial de impulsos. Por medio del análisis logarítmico se determinó un potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) de -0.023 V, con una pendiente de 0.0776, lo cual indica que el sistema no se comporta conforme a la ley de Nernst.

Al realizar el análisis de una muestra de granos de cacao procedentes de la región de Tabasco, se determinaron 1.34% de teobromina y 0.18% de cafeína. También, se determinó mediante seguimiento de la reacción de Fehling un contenido de 0.84% de azúcares reductores y 0.57% de sacarosa.

La determinación del porcentaje de teobromina, cafeína, así como el porcentaje de azúcares reductores y sacarosa en cacao mediante estudios analíticos permitirá que en posteriores trabajos se puedan llegar a establecer metodologías o protocolos que permitan tener una noción de la calidad relativa del cacao, además de poder optimizar los procesos de cultivo, secado y fermentado pues dependiendo de factores como el tiempo y las condiciones en que se realizan estos procesos se afecta el porcentaje de los mismos en la materia prima final; con los métodos analíticos será posible la determinación de estos analitos de forma rápida de modo que se pueda tener un seguimiento de los mismos tras cada proceso y así determinar las mejores condiciones para el procesamiento del cacao, lo cual permitirá determinar de forma adecuada el precio del mismo de acuerdo al perfil de los productos que se pueden obtener al procesar la semilla. También como se mencionó anteriormente, analitos como la teobromina y cafeína tienen efectos en la salud, por lo cual su determinación nos dará una idea de los efectos que puedan tener en el consumidor y a su vez nos asegura que el producto que se consuma tendrá no solo una aportación sensorial y de degustación en el consumidor final sino que a su vez aportará beneficios a la salud del mismo.

Finalmente, se determinaron señales de reducción para los metales Cu(II), Zn(II), Cd(II) y Pb (II), en 22.4 mV, -997 mV, -571 mV y -381 mV respectivamente; estas señales son dependientes de la concentración del analito en disolución, por lo cual se determinaron LDD de  $2.54 \times 10^{-7}$  mol/L,  $5.83 \times 10^{-7}$  mol/L,  $4.43 \times 10^{-7}$  mol/L y  $1.26 \times 10^{-7}$  mol/L respectivamente mediante polarografía diferencial de impulsos.

Al realizar el análisis de una muestra de granos de cacao procedentes de la región de Tabasco, se determinó 4.39% de Zn(II) en la muestra; por su parte los demás metales se encontraron ausentes o se encuentran en concentraciones que no superan los LDD obtenidos.

## **7. Perspectivas a futuro.**

Aplicar las técnicas aquí presentadas a un mayor número de muestras de granos de cacao.

Aplicar las técnicas aquí presentadas a granos de cacao sometidos a diferentes condiciones de procesos de cultivo, secado y fermentado de forma que se puedan obtener las condiciones para el cultivo de semillas de mejor calidad, las cuales generen a su vez productos finales de mayor calidad.

Para completar este trabajo, se propone realizar un estudio de las curvas de  $i/E$  mediante el uso de voltamperometría cíclica con la finalidad de determinar el mecanismo, así como la cinética de las reacciones electroquímicas en el electrodo de gotas de mercurio para la teobromina y la cafeína.

## 8 Bibliografía

- 1.-Andalón, M. (2010). *El cacao en Mesoamérica: aspectos naturales y culturales*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad Universitaria.
- 2.-Hernández, C. (2018) *Análisis de la composición química del cacao, extracción y estudio de compuestos antioxidantes en genotipos del banco de germoplasma de México*. (Tesis de Doctorado) Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- 3.-Haskell C.F., Kennedy D.O., Milne A.L., Wesnes K.A. y Scholey A.B. (2008). The effects of L-theanine, caffeine and their combination on cognition and mood. *Biological Psychology*, 77(2), 113–122.
- 4.-Cienfuegos-Jovellanos, E. (2016) *Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli)fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido*. (Tesis de Doctorado) Universidad de Murcia. Murcia, España.
- 5.-Cordella. C, Moussa I., Martel A.-C., Sbirrazzuoli N. y Louisette L.-C. (2002) Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique-oriented perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1751–1764.
- 6.-Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. (Diario Oficial de los Estados Unidos Mexicanos) CDMX, México, 10 de febrero de 2012, recuperado de: “<http://www.salud.gob.mx/cdi/nom/compi/NOM-218-SSA1-2011.pdf>”
- 7.-Norma Oficial Mexicana NOM-186-SSA1/SCFI-2013 Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba. (Diario Oficial de los Estados Unidos Mexicanos) CDMX, México, 28 de marzo de 2014, recuperado de: “<http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/2010/186sscfi2014.pdf>”.

8.-Federación de Malasia, Edicto de Gobierno MS 871:2001. Especificaciones para el cacao en polvo de Malasia (Departamento de estándares de malasia) Putrajaya, Malasia, 2001, recuperado de:

“<https://law.resource.org/pub/my/ibr/ms.871.2001.pdf>”

9.-Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 176:2018. Cacao en grano. Requisitos. (Instituto Ecuatoriano de Normalización) Quito, Ecuador, febrero de 2018, recuperado de: “[https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_176-5.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_176-5.pdf)”.

10.-Norma Técnica de Costa Rica INTE/ISO 23-02-04-09, Cacao y productos derivados del cacao –Cacao en grano- Clasificación y requisitos. (Instituto de normas técnicas de Costa Rica), Costa Rica, 23 de julio de 2009, recuperado de: “<http://canacacao.org/wp-content/uploads/INTE-23-02-04-09.pdf>”

11.-Codex Stan 105-1981. Norma para el cacao en polvo (cacaos) y las mezclas secas de cacao con azúcares. (FAO/OMS). 2016, recuperado de: “[http://www.fao.org/input/download/standards/68/CXS\\_105s.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/68/CXS_105s.pdf)”.

12.-Directiva 2000/36/CE, Productos de cacao y de chocolate destinados a la alimentación humana. (Diario Oficial consejo de la Unión Europea), 23 de junio de 2000, recuperado de:

“<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32000L0036>”

13.-CAOBISCO/ECA/FCC. *Cocoa Beans: Chocolate and Cocoa industry Quality Requirements*. Septiembre 2015. Recuperado de:

”[http://www.cocoaquality.eu/data/Cocoa%20Beans%20Industry%20Quality%20Requirements%20Apr%202016\\_En.pdf](http://www.cocoaquality.eu/data/Cocoa%20Beans%20Industry%20Quality%20Requirements%20Apr%202016_En.pdf)”.

14.-Vega, A., Reyes, S., De León, J., Bonilla, A. y Franco, H. (2014). Cuantificación de cafeína en cafés comerciales de Panamá. *Ciencia y Tecnología*, 30(2), 57-64, recuperado de:

“<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/cienciaytecnologia/article/download/20346/20495>”

- 15.-Barriga, P. (2012). *El cacao como medicamento en las recetas y remedios novohispanos. Siglos XVI al XVIII.* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad Universitaria.
- 16.-Arvelo, M., Delgado, T., Maroto, S., Rivera, J., Higuera, I. y Navarro, A. (2016). Estado actual sobre la producción y el comercio del cacao en América 2016. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA San José (Costa Rica); Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. CIATEJ Guadalajara (México).* 15-20. Recuperado de: <https://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2017/BVE17048806e.pdf>.
- 17.-Peláez, P., Bardón, I. y Camasca, P. (2016). Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor. *Scientia Agropecuaria.* 7(4), 355-365.
- 18.-Physical and chemical information on cocoa beans, butter, mass and powder (2012). International Cocoa Organization. Costa de Marfil. Recuperado de: “<https://www.icco.org/faq/61-physical-and-chemical-information-on-cocoa/106-physical-and-chemical-information-on-cocoa-beans-butter-mass-and-powder.html>”.
- 19.-Sinche, E. (2011) *Evaluación del tiempo de fermentación del grano de cacao Criollo (Theobroma cacao L.) para la obtención de la pasta.* (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional del Centro del Perú. Satipo, Perú.
- 20.-Guerrero, M. (2006) *Estudio electroquímico para el control de calidad en la producción de fosfatos grado alimentario. Determinación de trazas metálicas.* (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad Universitaria.
- 21.-Romero, D. (2010) *Estudio de la calidad de la miel basado en procedimientos electroquímicos* (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad Universitaria.
- 22.-Martínez, J. (2016) *Determinación por métodos analíticos de la calidad de la miel de abejas nativas sin aguijón (Apidae: meliponini) en la cuenca del Balsas,*



*Michoacán México.* (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad Universitaria.

23.-Amare, M., Aklog, S. Electrochemical Determination of Caffeine Content in Ethiopian Coffee Samples Using Lignin Modified Glassy Carbon Electrode. (2017) *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017(6) 1-8.

24.-Budavari S., (1989). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (11° edición pp.-248,1460-1461)Rahway, N.J U.S.A. , MERCK&CO., INC.

25.-Carl Roth GmbH + Co KG (2016). Ficha de datos de seguridad. Teobromina ≥ 99% Ph.Eur., para la bioquímica. (8963), recuperado de: “[https://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/8/SDB\\_8963\\_ES\\_ES.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/sdb/es/8/SDB_8963_ES_ES.pdf)”

26.-Harold, E., Ronald, S y Ronald, S. (1988). *Análisis Químico de Alimentos de Pearson*. México, Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 308-321.

27.-Sol, A., Naranjo, J., Córdova, V., Ávalos de la Cruz D. y Zaldívar CruzJ. (2017). Caracterización bromatológica de los productos derivados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Chontalpa, Tabasco, México. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, (14), 2817-2830.

28.-Descubre Teobromina. (22-08-2011) Molecule of the Week Archive: Theobromine. Washington, D.C. U.S.A: American Chemical Society: Chemistry for life. Recuperado de: “<https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/t/theobromine.html>”

29.-Sigma Aldrich. (2019). Ficha de Datos de Seguridad. (102584), recuperado de: “[http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/msds/MDA\\_CHEM-102584?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F](http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/msds/MDA_CHEM-102584?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F).”

30.-Weinberg, B. y Bealer, B., (2001). *The world of caffeine: the science and culture of the world's most popular drug*. New York, U.S.A. Routledge. Recuperado de: “<https://books.google.com.mx/books?id=YdpL2YCGLVYC&lpq=PR20&dq=caffeine%20discovery&hl=es&pg=PR4#v=onepage&q=caffeine%20discovery&f=true>”.

- 31.-Martinez, E., Oñatibia, A. y Franco, R. (2015). The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology*, 6(30). 1-4
- 32.-Lo Coco, F., Lanuzza, F., Micali, G. y Cappellano, G. (2007). Determination of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in by-product of Cupuacu and Cacao seeds by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 45(5). 273-275.
- 33.-Injac, R., Srdjenovic, B., Prijatelj, M., Boskovic, M., Karljickovic-Rajic, K. y Strukelj, B. (2008). Determination of Caffeine and Associated Compounds in Food, Beverages, Natural Products, Pharmaceuticals, and Cosmetics by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 46(2). 137-143.
- 34.-Harris, D. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*, Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.
- 35.-Skoog, D., West, D., Holler, F. y Crouch, S. (2005) *Fundamentos de Química Analítica*. (8ª Edición). México D.F., México: Editorial Thomson.
- 36.-Baeza, A. y García A. de J., (2011) *Principios de electroquímica analítica: Colección de documentos de apoyo*. Recuperado de: "[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOC\\_APOY\\_FUNDAMENTOS\\_ELECTROANALITICA\\_2011\\_16333.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOC_APOY_FUNDAMENTOS_ELECTROANALITICA_2011_16333.pdf)."
- 37.-Briones, U. (2014) *Estudio electroquímico de la purpurina* (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad Universitaria.
- 38.-García, J. (2019) *Estudio de la calidad del café en base a sus propiedades químico-analíticas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad Universitaria.
- 39.-Miller, J., Miller, J., (1993), *Estadística para química analítica*, USA, Wilmington, Delaware, Addison-Wesley Iberoamerican, S.A.
- 40.-Afoakwa, E, Kongor, J., Takrama, J. y Budu, A. (2013). Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-

conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 20(4), 1843-1853, recuperado de:

"<https://pdfs.semanticscholar.org/8f7f/2de7f0f1bf2ed3c7af2ea8a75f4ef5d4c945.pdf>."

41.-Ramtahal, G., Chang, I., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., Sukha, B. y Maharaj, K. (2015). Cost-effective Method of Analysis for the Determination of Cadmium, Copper, Nickel and Zinc in Cocoa Beans and Chocolates. *Journal of Food Research*, 4(1), 193-199. Recuperado de:

"<http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jfr/article/view/37138>"

42.-Opoku, J. (2015). *Occurrence Levels of Heavy Metals in fermented cocoa beans and cocoa derived products produced in Ghana*. (Maestría en filosofía [estudios de alimentos]). Universidad de Ghana, Ghana.

## 9 Anexos

### 9.1. Análisis logarítmico

#### 9.1.1 Análisis logarítmico de la teobromina.

Para el caso de la teobromina se obtuvieron a partir de la técnica de polarografía diferencial de impulsos para la señal de reducción observada en un potencial de -127 mV, con una concentración en celda de teobromina de  $2.27 \times 10^{-4}$  mol/L, los valores de  $\log \left( \frac{i-id}{-i} \right)$  vs V los cuales se aprecian en la tabla A1, con estos datos se trazó la gráfica de la figura A1.

Tabla A1.- Valores de  $\log \left( \frac{i-id}{-i} \right)$  vs V obtenidos para la teobromina utilizando la técnica de polarografía diferencial de impulsos.

$\log \left( \frac{i-id}{-i} \right)$	V
0.989860369	0.029449
0.919738899	0.024414
0.891234567	0.019379
0.804325695	0.014343
0.758303753	0.0093079
0.702620024	0.0042725
0.649033645	-0.00076294
0.612548085	-0.0057983
0.552757937	-0.010834
0.510806065	-0.015869
0.457968349	-0.020905
0.39777113	-0.02594
0.350768626	-0.030975

$\log \left( \frac{i-id}{-i} \right)$	V
0.294531703	-0.036011
0.233457023	-0.041046
0.168635869	-0.046082
0.114307229	-0.051117
0.080377813	-0.056152
-0.002527647	-0.061188
-0.068849682	-0.066223
-0.132031251	-0.071259
-0.196260804	-0.076294
-0.259486918	-0.081329
-0.323584348	-0.086365
-0.392950242	-0.0914
-0.471788205	-0.096436

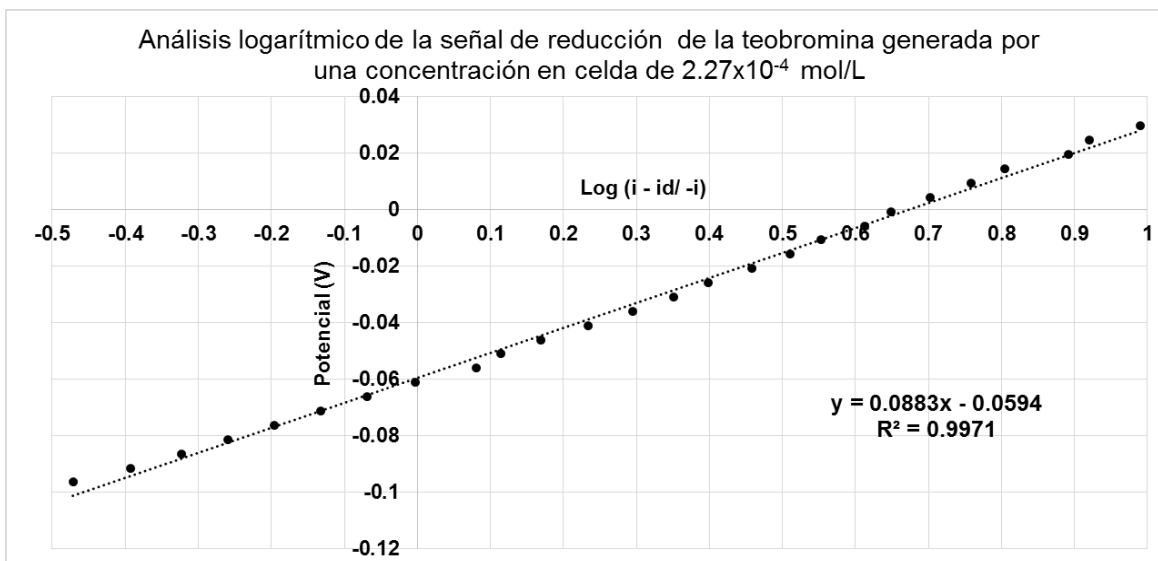


Figura A1- Análisis logarítmico de la señal de reducción en el potencial de -127 mV generada por una concentración en celda de  $2.27 \times 10^{-4}$  mol/L de teobromina.

El valor de la ordenada al origen para el análisis logarítmico (figura A1) indica que la señal de reducción posee un  $E_{1/2} = -0.059$  V y ya que el valor de la pendiente de la recta es 0.0883, que es mayor a 0.059, se puede considerar que la reducción del sistema en este potencial no se comporta conforme a la ley de Nernst por lo cual no se trata de un sistema reversible.

### 9.1.2 Análisis logarítmico de la cafeína.

Para el caso de la cafeína se procedió al análisis logarítmico de forma idéntica a la de la teobromina, para lo cual se obtuvo a partir de la técnica de polarografía diferencial de impulsos para la señal de reducción observada en un potencial de -117 mV, con una concentración en celda de cafeína de  $1.80 \times 10^{-4}$  mol/L, los valores de  $\log \left( \frac{i - id}{-i} \right)$  vs V, con estos datos se trazó la gráfica de la figura A2.

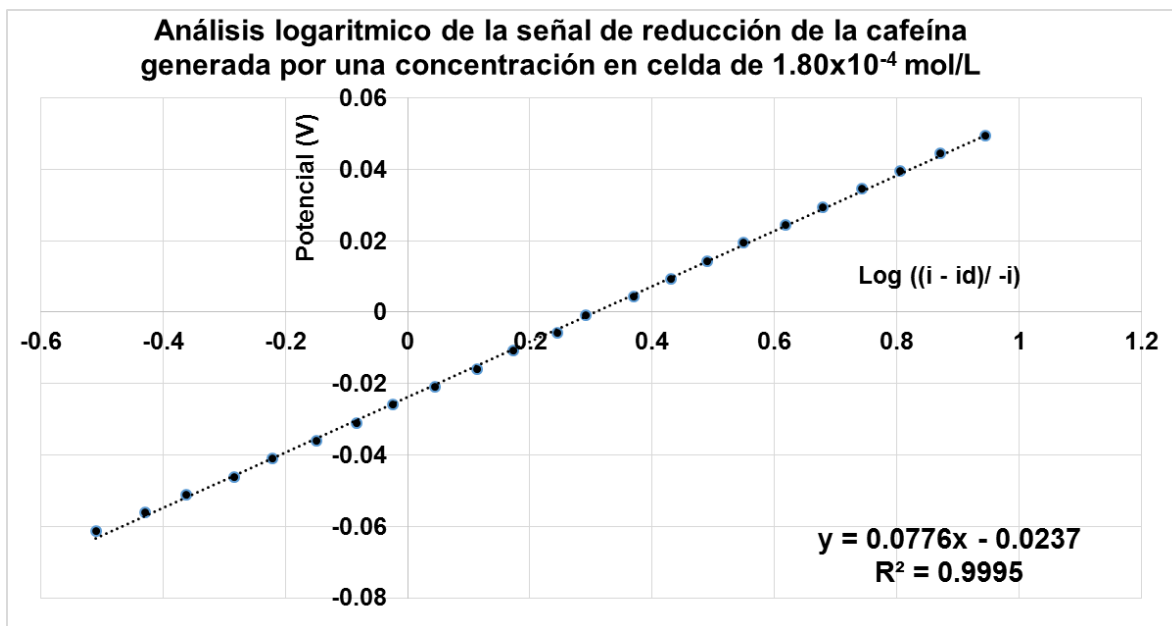


Figura A2.- Análisis logarítmico de la señal de reducción en el potencial de -117 mV generada por una concentración en celda de  $1.80 \times 10^{-4}$  mol/L de cafeína.

El valor de la ordenada al origen para el análisis logarítmico (figura A2) indica que la señal de reducción posee un  $E_{1/2} = -0.0237$  V y ya que el valor de la pendiente de la recta es 0.0776, que es mayor a 0.059, se puede considerar que la reducción del sistema en este potencial no se comporta conforme a la ley de Nernst.

## 9.2 Determinación del límite de detección y límite de cuantificación para la teobromina y cafeína.

### 9.2.1 Teobromina

Como ejemplo se tomaron los datos de los polarogramas del estándar de teobromina en un electrolito soporte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L.

A partir del polarograma que se presenta en la figura A3, se obtuvieron los datos de intensidad de corriente para cada adición de un estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L, con los cuales se realizó la curva que se muestra en la figura A4.

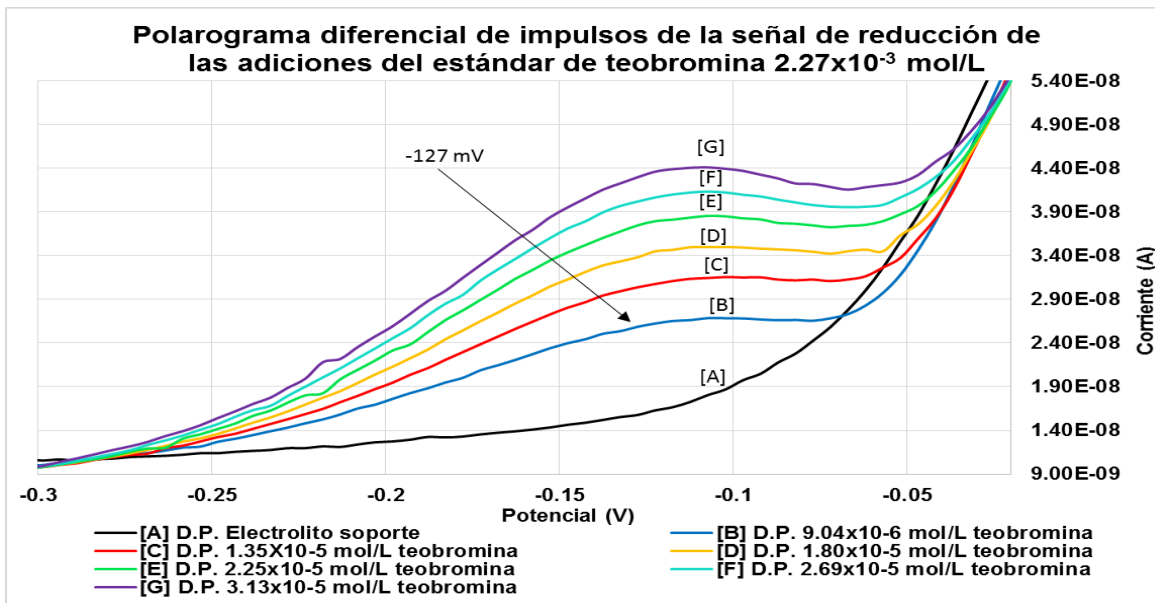


Figura A3.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado para la señal generada por las adiciones del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L, en un electrolito soporte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo fue desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido fue de 3.4 mV/s, la amplitud del pulso de -50 mV y el tiempo del pulso de 80 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4.

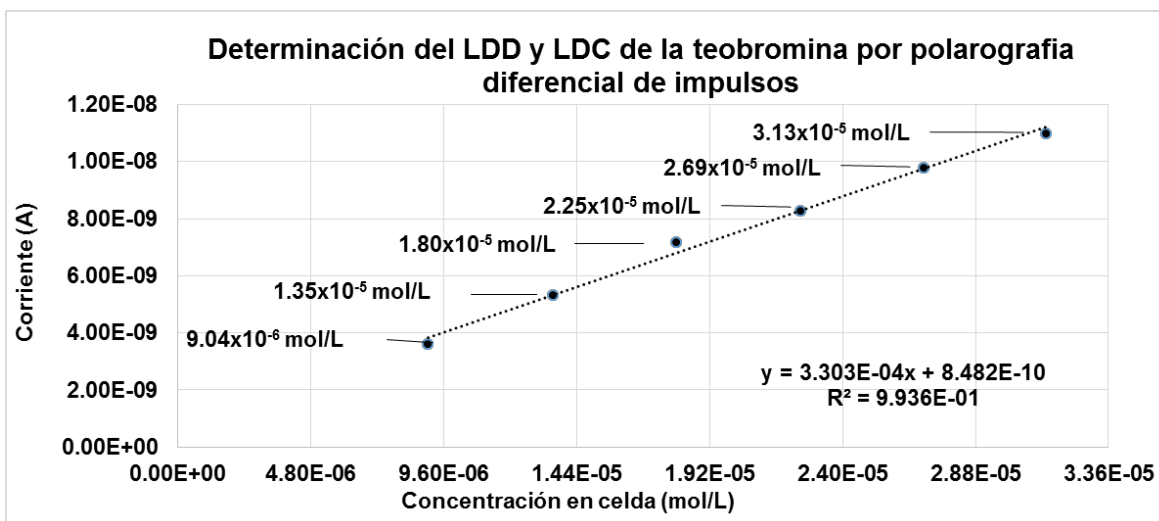


Figura A4.- Determinación del LDD y LDC del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L en el potencial de pico de -127 mV.

A partir de esta curva se obtienen la siguiente ecuación y coeficiente de correlación (ecuación A1):

$$Y = 3.303 \times 10^{-4} x + 8.482 \times 10^{-10} \quad R^2 = 0.9936 \quad n = 6$$

Dónde: Y: Intensidad de corriente experimental (en adelante  $i_{exp}$ ).

X: Concentración en la celda del estándar añadido (en adelante  $C_{exp}$ ).

$R^2$ : Coeficiente de correlación de la recta.

n: Número de datos experimentales.

A partir de esta ecuación, se despejan los valores de concentración, para obtener los nuevos valores de corriente calculada ( $i_{calc}$ ), que se requieren para el análisis estadístico.

$$\text{Ejemplo: } Y = 3.303 \times 10^{-4} (9.04 \times 10^{-6}) + 8.482 \times 10^{-10}$$

$$Y = 3.84 \times 10^{-9}$$

A partir de estos valores calculados, se determinaron los límites de detección de corriente y de concentración con la ayuda de las siguientes fórmulas:

Tabla A2.- Fórmulas de límites de detección y desviación estándar [20, 39].

$S_{i/c} = \{ \sum (i_{exp} - i_{calc})^2 / n - 2 \}^{1/2}$
$S_m = S_{i/c} / \{ \sum (C_{exp} - C_{prom})^2 \}^{1/2}$
$S_b = S_{i/c} / \{ \sum C_{exp}^2 / n \sum (C_{exp} - C_{prom})^2 \}^{1/2}$
$i_{LDD} = b + 3S_b$
$LDD = 3S_b / m$
$LDC = 10S_b / m$

$S_{i/c}$ : Desviación estándar de la recta.

$S_m$ : Desviación estándar de la pendiente

$S_b$ : Desviación estándar de la ordenada.

$i_{LDD}$ : Límite de detección de las corrientes

LDD: Límite de detección

LDC: Límite de cuantificación

m: Pendiente

b: Ordenada de la ecuación de linealidad.



Al sustituir los datos obtenidos del estándar de teobromina ( $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L) en las fórmulas presentadas en la tabla A2, se obtiene la tabla A3. Los resultados de las operaciones se presentan en la tabla A4.

Tabla A3.- Sustitución de valores obtenidos de la curva de calibración de la teobromina en las fórmulas de la tabla A2.

$S_{i/c} = \{ 2.44 \times 10^{-19} / 6 - 2 \}^{1/2}$
$S_m = 2.47 \times 10^{-10} / \{ 3.48 \times 10^{-10} \}^{1/2}$
$S_b = 2.47 \times 10^{-10} / \{ 2.80 \times 10^{-9} / 6 * 3.48 \times 10^{-10} \}^{1/2}$
$iLDD = 8.48 \times 10^{-10} + 3 * 2.13 \times 10^{-10}$
$LDD = 3 * 2.13 \times 10^{-10} / 3.303 \times 10^{-4}$
$LDC = 10 * 2.13 \times 10^{-10} / 3.303 \times 10^{-4}$

Tabla A4.- Resultados de la sustitución de datos experimentales de las adiciones del estándar de teobromina  $2.27 \times 10^{-3}$  mol/L en las fórmulas de la tabla A2.

S i/c	Sm	Sb	iLDD
$2.47 \times 10^{-10}$	$1.32 \times 10^{-5}$	$2.13 \times 10^{-10}$	$1.49 \times 10^{-9}$
LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
$1.94 \times 10^{-6}$	0.35	$6.45 \times 10^{-6}$	1.16

## 9.2.2 Cafeína

Al aplicar esta misma metodología para la cafeína se obtienen los siguientes datos:

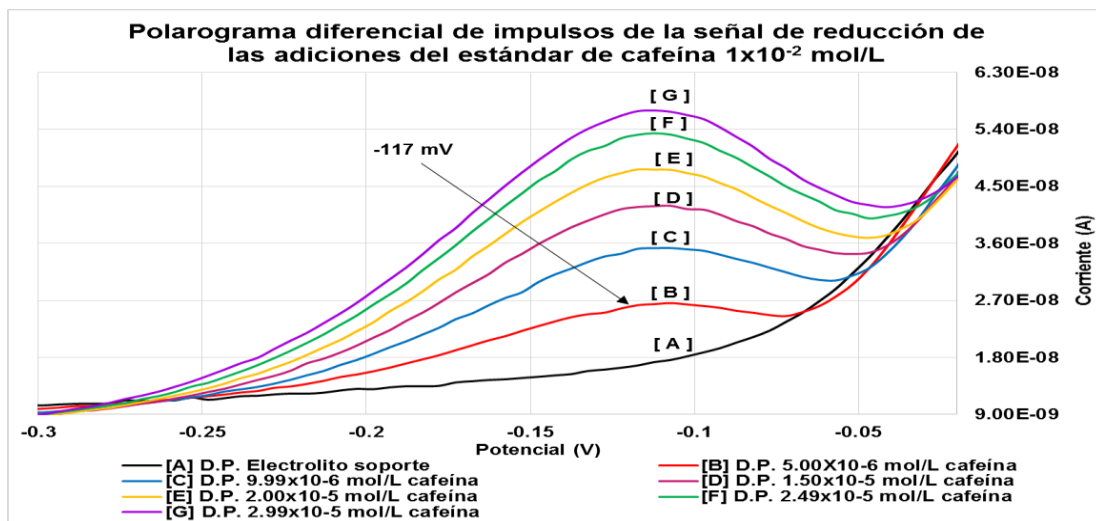


Figura A5.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de las adiciones del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L, en un electrolito soporte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El barrido se realizó en el sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo fue desde 200 mV hasta -750 mV, la velocidad de barrido fue de 3.4 mV/s, la amplitud del pulso de -50 mV y por un tiempo del pulso de 80 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4.

A partir de los datos obtenidos por el polarograma de la figura A5 se trazó una gráfica de intensidad de corriente contra concentración.

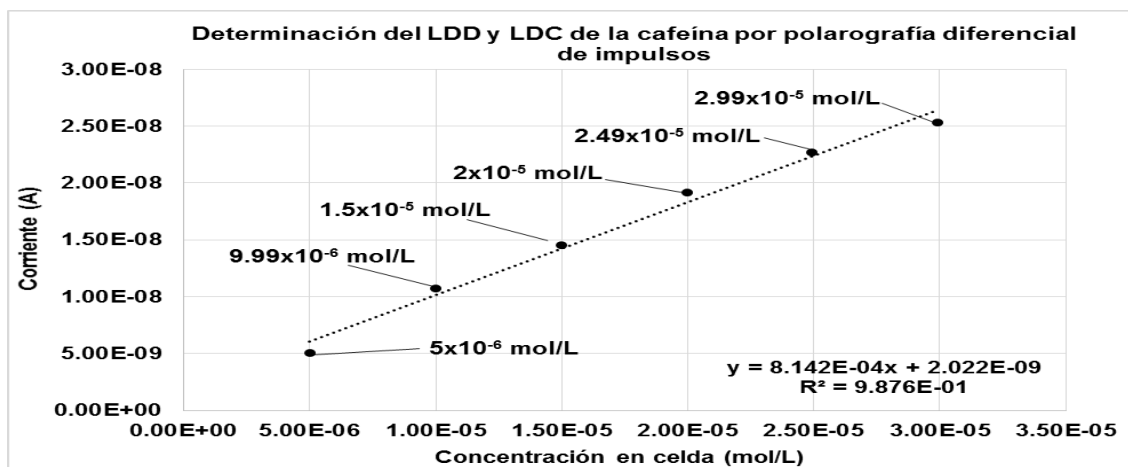


Figura A6.- Determinación del LDD y LDC del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L en el potencial -117 mV, los datos de esta curva provienen del polarograma de la figura A5.

A partir de esta curva se obtienen la siguiente ecuación y coeficiente de correlación (ecuación A2):

$$Y = 8.142 \times 10^{-4} X + 2.022 \times 10^{-9} \quad R^2 = 0.9876 \quad n = 6$$

Tabla A5.- Resultados de la sustitución de datos experimentales de las adiciones del estándar de cafeína  $1 \times 10^{-2}$  mol/L en las fórmulas de la tabla A2.

S i/c	Sm	Sb	iLDD
$9.50 \times 10^{-10}$	$4.56 \times 10^{-5}$	$1.02 \times 10^{-9}$	$5.08 \times 10^{-9}$
LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
$3.75 \times 10^{-6}$	0.73	$1.25 \times 10^{-5}$	2.43

### 9.3.- Cálculo del % de humedad en la muestra.

Debido a que los valores reportados en la bibliografía se encuentran calculados en base seca, se procedió a determinar el porcentaje de humedad de la muestra mediante gravimetría, para lo cual se utilizó un horno eléctrico para secar la muestra a  $121.11^\circ\text{C}$  por un periodo de 1:30 horas, después de lo cual las muestras en sus recipientes se llevaron a un desecador hasta alcanzar peso constante obteniendo:

$$\left( \frac{5.6652 \text{ g muestra humeda} - 5.4619 \text{ g muestra seca}}{5.6652 \text{ g de cacao}} \right) \times 100 = 3.59\% \text{ Humedad}$$

$$\left( \frac{5.2240 \text{ g muestra humeda} - 5.0440 \text{ g muestra seca}}{5.2240 \text{ g de cacao}} \right) \times 100 = 3.45\% \text{ Humedad}$$

$$\left( \frac{5.5109 \text{ g muestra humeda} - 5.3200 \text{ g muestra seca}}{5.5109 \text{ g de cacao}} \right) \times 100 = 3.46\% \text{ Humedad}$$

Por lo cual se obtuvo una humedad promedio de 3.50%

#### 9.4.- Preparación de las disoluciones de Fehling y valoración de la disolución A de Fehling por polarografía.

##### Preparación solución B de Fehling:

$$(25 \text{ mL disolución}) \left( \frac{2.5 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ mL disolución}} \right) \left( \frac{40.01 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} \right) \\ = 2.5 \text{ g NaOH}$$

$$(25 \text{ mL disolución}) \left( \frac{1.2 \text{ mol } C_4H_4KNaO_6 * 4H_2O}{1000 \text{ mL disolución}} \right) \left( \frac{282.23 \text{ g } C_4H_4KNaO_6 * 4H_2O}{1 \text{ mol } C_4H_4KNaO_6 * 4H_2O} \right) \\ = 8.47 \text{ g } C_4H_4KNaO_6 * 4H_2O$$

Así que se pesan 2.5 g de NaOH y se disuelven con agua desionizada, después se agregan los 8.47 g pesados de  $C_4H_4KNaO_6 * 4H_2O$ , se disuelven y se lleva a un aforo de 25 mL

##### Preparación solución A de Fehling:

$$(25 \text{ mL disolución}) \left( \frac{2.3 \times 10^{-1} \text{ mol } CuSO_4}{1000 \text{ mL disolución}} \right) \left( \frac{156.60 \text{ g } CuSO_4}{1 \text{ mol } CuSO_4} \right) \\ = 0.9005 \text{ g } CuSO_4$$

Así que se pesan 0.9005g de  $CuSO_4$  y se disuelven con agua desionizada, después se llevan a un aforo de 25 mL.

## Valoración de la disolución A de Fehling

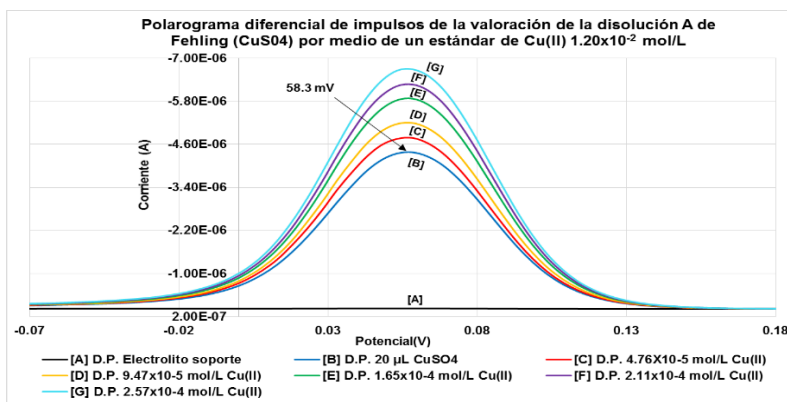


Figura A7.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado para la señal de las adiciones del estándar de cobre 1.20x10<sup>-2</sup> mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El electrolito soporte utilizado fue HNO<sub>3</sub>/KNO<sub>3</sub> 0.5 mol/L, el barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo abarca desde 300 mV hasta -200 mV, la velocidad de barrido fue de 5 mV/s, la amplitud del pulso de 50 mV y el tiempo del pulso de 40ms, el tamaño de gota empleado fue de 6.

Se observa un aumento de la corriente pico tanto en la curva de la adición de la disolución A de Fehling como en las curvas de las adiciones del estándar de Cu(II) 1.20x10<sup>-2</sup> mol/L, en el potencial 58.3 mV, se utilizaron las intensidades de pico en este potencial para determinar la concentración de la disolución A de Fehling mediante una curva de adiciones patrón que se aprecia en la figura A8:

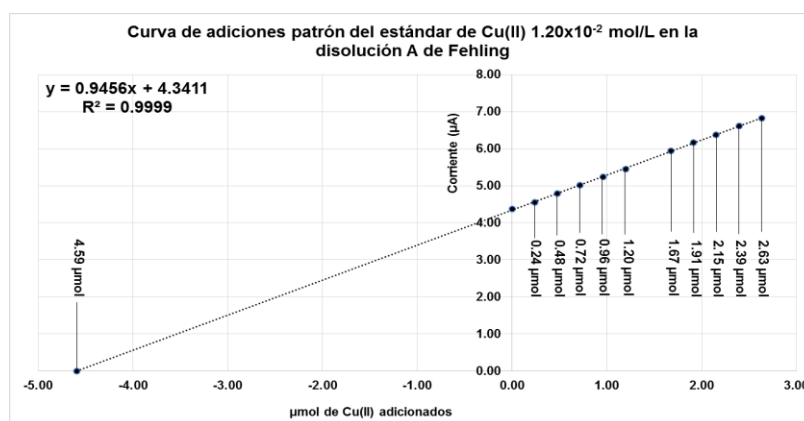


Figura A8.- Curva de la intensidad de corriente de pico registrada en el potencial de la señal generada por las adiciones patrón del estándar de Cu(II) 1.20x10<sup>-2</sup> mol/L realizadas a la disolución A de Fehling. Nota: el punto -4.59 µmol es la extrapolación en la ecuación de la recta para obtener los moles del analito en la celda.

Con esta curva se obtuvo la siguiente ecuación de la recta (ecuación A3):

$$Y = 0.9456 X + 4.3411$$

Ecuación A3.- Ecuación de la recta obtenida al graficar la intensidad de corriente del pico de las adiciones del estándar de Cu (II) en el potencial 58.3 mV.

Con la ecuación A3 se obtuvo:

$$\left| \frac{-4.3411}{0.9456} \right| = 4.59 \mu\text{mol Cu(II) en celda}$$

$$\left( \frac{4.59 \mu\text{mol Cu(II)}}{20 \mu\text{L}} \right) \left( \frac{1 \times 10^6 \mu\text{L}}{1 \text{ L}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol}}{1 \times 10^6 \mu\text{mol}} \right) = 2.29 \times 10^{-1} \text{ mol/L CuSO}_4$$

### 9.5.- Determinación del límite de detección y límite de cuantificación del Zn(II), Cd(II) y Pb(II).

A partir del polarograma que se presentan en la figura A9, se obtuvieron los datos de intensidad de corriente para cada valor de concentración de Zn(II) añadido, los cuales se presentan en la curva de la figura A10.

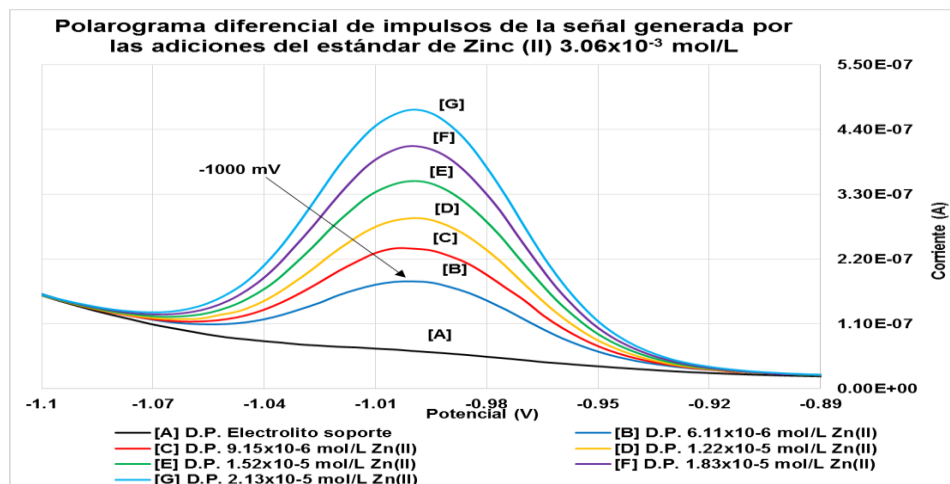


Figura A9.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado para la señal de las adiciones del estándar de Zinc  $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El electrolito soporte utilizado fue  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  0.1 mol/L, el barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo comprendió desde 264 mV hasta -1300 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4.

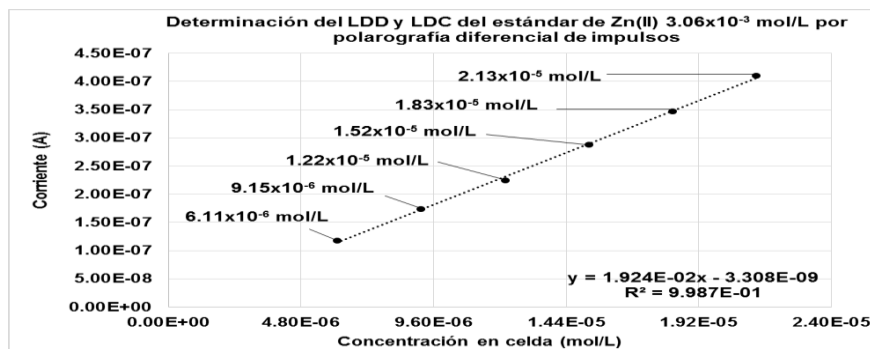


Figura A10.- Determinación del LDD y LDC del estándar de Zn(II)  $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L en el potencial  $-1000$  mV, con base en la concentración presente en celda.

A partir de esta curva se obtienen la siguiente ecuación y coeficiente de correlación (ecuación A4):

$$Y = 1.924 \times 10^{-2} X - 3.308 \times 10^{-9} \quad R^2 = 0.9987 \quad n = 6$$

Tabla A6.- Resultados de la sustitución de datos experimentales de las adiciones del estándar de Zn(II)  $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L en las fórmulas de la tabla A2.

S i/c	Sm	Sb	ILDD
$4.32 \times 10^{-9}$	$3.40 \times 10^{-4}$	$3.74 \times 10^{-9}$	$1.45 \times 10^{-8}$
LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
$5.83 \times 10^{-7}$	0.04	$1.94 \times 10^{-6}$	0.13

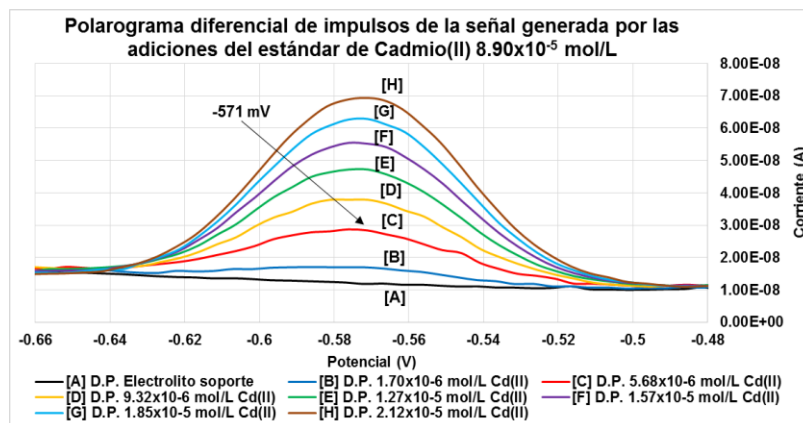


Figura A11.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado para la señal de las adiciones del estándar de Cadmio  $8.90 \times 10^{-5}$  mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El electrolito soporte empleado fue  $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$  0.1 mol/L, el barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo comprendió desde 264 mV hasta  $-1300$  mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de  $-50$  mV y tiempo de pulso de 40 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4.

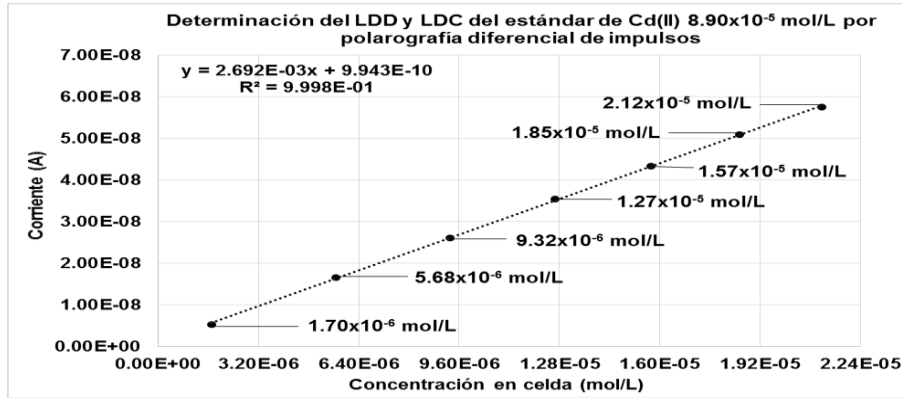


Figura A12.- Determinación del LDD y LDC del estándar de Cd(II) 8.90x10<sup>-5</sup> mol/L en el potencial -571 mV, con base en la concentración presente en celda.

A partir de esta curva se obtienen la siguiente ecuación y coeficiente de correlación (ecuación A5):

$$Y = 2.692 \times 10^{-3} X + 9.943 \times 10^{-10} \quad R^2 = 0.9998 \quad n = 7$$

Tabla A7.- Resultados de la sustitución de datos experimentales de las adiciones del estándar de Cd(II) 8.90x10<sup>-5</sup> mol/L en las fórmulas de la tabla A2.

S i/c	Sm	Sb	iLDD
3.18x10 <sup>-10</sup>	1.86x10 <sup>-5</sup>	3.98x10 <sup>-10</sup>	2.19x10 <sup>-9</sup>
LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
4.43x10 <sup>-7</sup>	0.05	1.48x10 <sup>-6</sup>	0.17

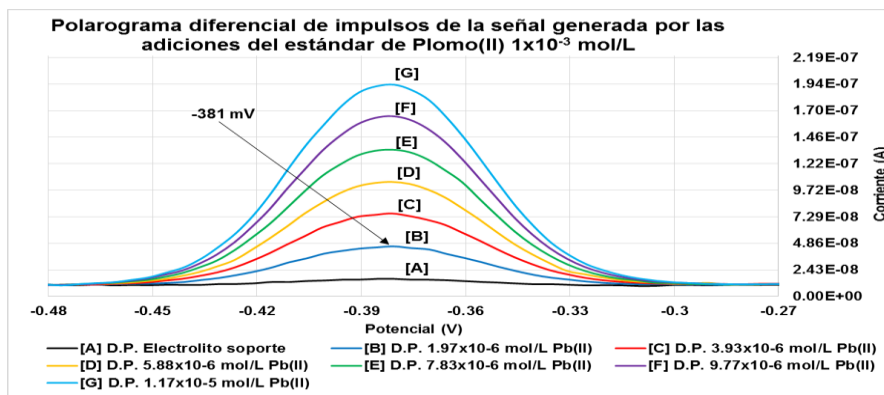


Figura A13.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado para la señal de las adiciones del estándar de Plomo 1x10<sup>-3</sup> mol/L, usando un electrodo de trabajo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El electrolito soporte utilizado fue HNO<sub>3</sub>/KNO<sub>3</sub> 0.1 mol/L, el barrido se realizó en sentido positivo a negativo, el intervalo de trabajo comprendió desde 264 mV hasta -1300 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms, el tamaño de gota utilizado fue de 4.



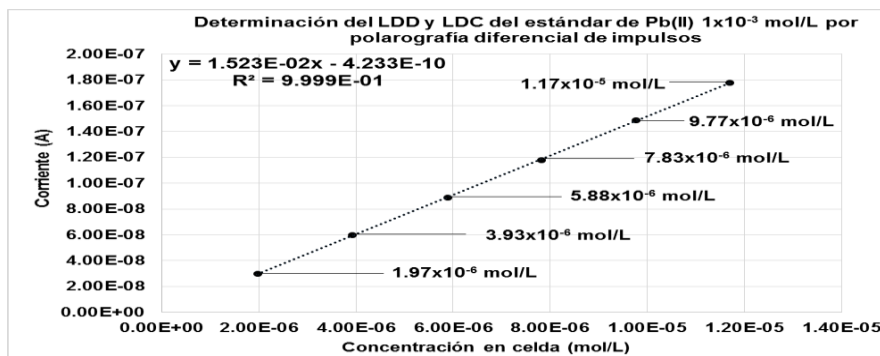


Figura A14.- Determinación del LDD y LDC del estándar de Pb(II) 1x10<sup>-3</sup> mol/L en el potencial -381 mV, con base en la concentración presente en celda.

A partir de esta curva de calibración se obtienen la siguiente ecuación y coeficiente de correlación (ecuación A6):

$$Y = 1.523 \times 10^{-2} X - 4.233 \times 10^{-10} \quad R^2 = 0.9999 \quad n = 6$$

Tabla A8.- Resultados de la sustitución de datos experimentales de las adiciones del estándar de Pb(II) 1x10<sup>-3</sup> mol/L en las fórmulas de la tabla A2.

S i/c	Sm	Sb	iLDD
5.97x10 <sup>-10</sup>	7.33x10 <sup>-5</sup>	6.38x10 <sup>-10</sup>	2.34x10 <sup>-9</sup>
LDD (mol/L)	LDD (ppm)	LDC (mol/L)	LDC (ppm)
1.26x10 <sup>-7</sup>	0.03	4.19x10 <sup>-7</sup>	0.09

### 9.6.- Cálculo del % Zinc en la muestra

Después de la adición de una alícuota del extracto en el electrolito soporte HNO<sub>3</sub>/KNO<sub>3</sub> 0.1 mol/L y posteriores adiciones de alícuotas del estándar de zinc 3.06x10<sup>-3</sup> mol/L se obtuvieron los siguientes resultados:

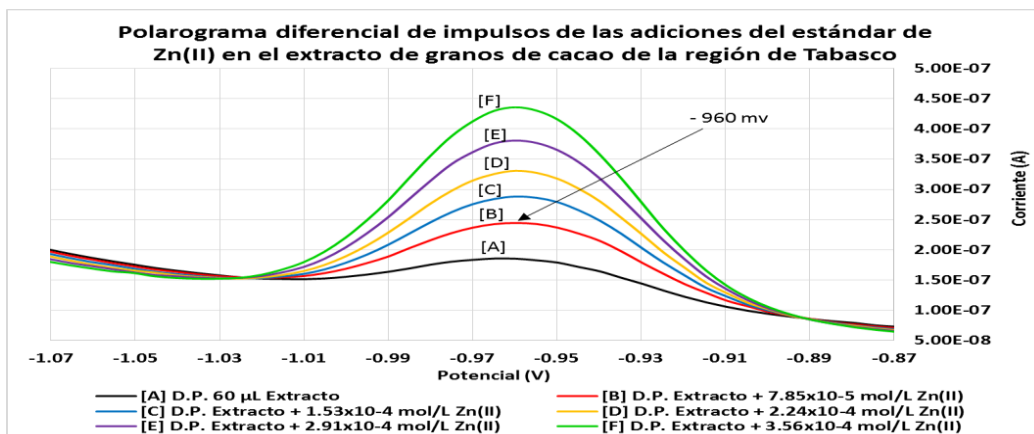


Figura A15.- Ejemplo de polarograma diferencial de impulsos con el intervalo recortado de las adiciones del estándar de Zn (II)  $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L en la muestra de granos de cacao. El barrido se realizó en dirección positiva a negativa, el intervalo de trabajo abarca desde 400 mV hasta -1300 mV, la velocidad de barrido de 5 mV/s, amplitud del pulso de -50 mV y tiempo de pulso de 40 ms, se trabajó con un tamaño de gota de 4. El zinc mostrado en la leyenda de la gráfica se refiere a la concentración de zinc en celda.

Como es posible ver un aumento de la corriente de pico tanto en la curva de la adición del extracto como en las curvas de las adiciones del estándar, en un potencial cercano en el cual se observó la señal del estándar de Zn(II)  $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L en la curva de calibración, se utilizaron las alturas de pico en este potencial para determinar la concentración del zinc en el extracto:

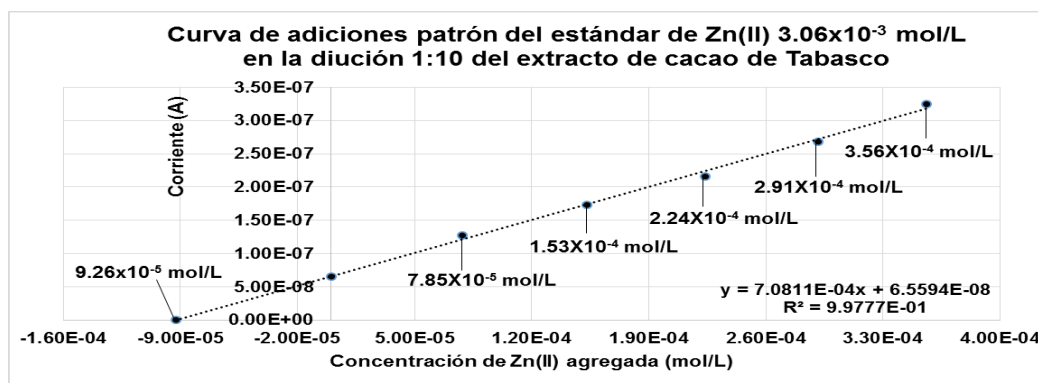


Figura A16.- Curva de la corriente de la altura del pico registrada por las adiciones patrón del estándar de Zinc (II)  $3.06 \times 10^{-3}$  mol/L en la dilución 1:10 del extracto de cacao de la región de Tabasco. Nota: el punto  $-9.2633 \times 10^{-5}$  mol/L es la extrapolación en la ecuación de la recta para obtener la concentración del analito en la celda.

Con esta curva se obtuvo la siguiente ecuación de la recta (ecuación A7):

$$Y = 7.0811 \times 10^{-4} X + 6.5594 \times 10^{-8}$$

Ecuación A7.- Ecuación de la recta obtenida al graficar la altura del pico de las adiciones del estándar en el potencial -960 mV, en el extracto de cacao de la región de Tabasco.

Con la ecuación A7 se obtuvo:

$$\left| \frac{-6.56 \times 10^{-8}}{7.08 \times 10^{-4}} \right| = 9.26 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ Zinc en celda.}$$

Con este dato podemos obtener la concentración en el extracto:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{9.26 \times 10^{-5} \text{ mol Zinc}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{10.06 \text{ mL celda}}{0.06 \text{ mL alicuota}} \right) \left( \frac{10}{1} \right) (5 \text{ mL extracto}) \\ & = 7.77 \times 10^{-4} \text{ mol de Zinc en el extracto.} \end{aligned}$$

Por lo cual la muestra contenía:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{7.77 \times 10^{-4} \text{ mol de Zinc}}{1.1964 \text{ g cacao}} \right) \left( \frac{65.38 \text{ g Zinc}}{1 \text{ mol Zinc}} \right) (100) \\ & = 4.24 \text{ g de Zinc /100 g de cacao base humeda.} \end{aligned}$$

Sin embargo se realiza una corrección debido a que los valores encontrados en la bibliografía están reportados en base seca:

$$\begin{aligned} & \left( \frac{4.24 \text{ g de Zinc}}{100 \text{ g cacao humedo}} \right) \left( \frac{100 \text{ g cacao humedo}}{96.5 \text{ g cacao seco}} \right) (100) \\ & = 4.39 \text{ g de Zinc /100 g de cacao base seca.} \end{aligned}$$

Por lo tanto se determinaron 4.39 g de zinc por cada 100 g de cacao base seca.

### **9.7.- Lavado del mercurio utilizado y cuidado del electrodo goteante de mercurio.**

El mercurio utilizado durante los análisis polarográficos es almacenado después de cada experimento para su posterior lavado y reutilización.

Para el lavado de mercurio primero se procede a elaborar una disolución de  $\text{HNO}_3$  al 8% y una disolución de EDTA 0.1 mol/L, la disolución de  $\text{HNO}_3$  se empleará junto con agua desionizada para realizar lavados sucesivos al mercurio; después de elaborar las disoluciones se procede a realizar un filtrado de mercurio con papel filtro y un pequeño orificio en el centro, esto con la finalidad de eliminar los contaminantes de mayor tamaño (polvo, etc.) después se procede a hacer el 1° lavado con agua desionizada y agitación durante un periodo de 1 hora para lo cual se trabaja en proporciones iguales de volumen de mercurio a lavar y agua, dentro de un sistema conformado por un agitador magnético, un vaso de precipitados y una parrilla de agitación, terminado este primer lavado, se transfiere el mercurio a un embudo de separación, se recolecta el agua usada en otro vaso de precipitados, se adiciona al vaso de precipitados inicial un volumen de la solución de  $\text{HNO}_3$  al 8% proporcional al volumen de mercurio, se inicia la agitación y se adiciona lentamente el mercurio desde el embudo de separación, terminada la adición se toma el tiempo de 1 hora para este 1° lavado con  $\text{HNO}_3$ , posteriormente se repite la metodología empleada para los posteriores lavados a realizar, que consiste en transferir el mercurio al embudo de separación y recolectar la disolución empleada en el lavado, se realizan de forma sucesiva lavados de agua desionizada y de  $\text{HNO}_3$  hasta realizar 5 lavados con  $\text{HNO}_3$  y 6 lavados con agua desionizada, después del 6° lavado con agua desionizada se realiza 1 lavado con la solución de EDTA 0.1 mol/L, después de este lavado se procede con los últimos lavados que constan de agua,  $\text{HNO}_3$  y agua, logrando en total 8 lavados con agua desionizada, 6 lavados con  $\text{HNO}_3$  y 1 lavado con EDTA. Finalmente el mercurio lavado se transfiere a un recipiente para su almacenamiento y se adiciona un pequeño volumen de agua y etanol en proporción (80:20) para su correcta conservación.

Los residuos de agua desionizada y EDTA se concentran hasta eliminar el disolvente y el residuo sólido se manda a tratamiento de residuos para su correcta disposición, para el caso de los residuos de  $\text{HNO}_3$ , se procede a neutralizar la acidez del medio, posteriormente se elimina el disolvente y finalmente el residuo sólido se manda a tratamiento de residuos para su correcta disposición.

En el caso del electrodo goteante de mercurio, se cuida que el nivel de mercurio no se encuentre por debajo de una marca que contiene el dispositivo, así como mantener la punta del capilar en agua desionizada cuando no se encuentre en uso, también se debe tener cuidado que el mercurio empleado no tenga mucho tiempo de haber sido lavado para evitar problemas con el óxido de mercurio el cual puede llegar a provocar un incorrecto funcionamiento del capilar al no generarse un goteo adecuado, finalmente antes y después de trabajar con el electrodo goteante de mercurio se debe realizar una limpieza del capilar con enjuagues de  $\text{HNO}_3$  y agua desionizada con la finalidad de evitar interferencias en el análisis de algún otro analito utilizado durante los experimentos.