
Determinación de cafeína y teobromina en cascarilla de cacao

Determination of caffeine and theobromine in cacao husk

José González Yaque*

<jgyaque@ucpejv.edu.cu>

Julio C. Pérez Suárez**

Enrique Gómez Contreras***

Damaris de la C. Salgado****

* Universidad de Ciencias Pedagógicas "Enrique Jose Varona", La Habana, Cuba, **Centro Nacional de Toxicología (CENATOX), Hospital Militar "Carlos J. Finlay", La Habana, Cuba, *** y ****Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

RESUMEN

El objetivo del artículo es proponer una práctica de laboratorio para las carreras de Química y Agropecuaria de la UCP "Enrique J. Varona" de La Habana, Cuba. Este material aborda un resumen de algunos métodos empleados para la extracción, aislamiento, identificación y caracterización estructural de la cafeína y la teobromina (alcaloides de la cascarilla del cacao) en la cascarilla de cacao. Constituye una guía o material auxiliar para los estudiantes en el desarrollo de las actividades prácticas de asignaturas como la Química Orgánica y el Análisis Químico.

Palabras clave: cacao, cafeína, teobromina, cromatografía.

ABSTRACT

The article's objective is to propose a laboratory practice for Química's and Agricultural racings of Pedagogical Sciences University "Enrique J. Varona", Havana, Cuba. This material, summary some methods employed to extract, isolate, identify and characterize structurally the caffeine and theobromine (alkaloids from cacao husk) and must be for the students a guide or auxiliary material to developing practical activities in subjects like Organic Chemistry or Chemistry Analysis.

Keywords: cacao, caffeine, theobromine, chromatography.

INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L. o comúnmente conocido como cacao pertenece a la familia Sterculiaceae, la cual está distribuida en toda América del Sur y América Central, así como en la mayor parte del continente africano y en la parte baja del continente europeo donde se presentan climas cálidos con altitudes de 100 msnm hasta 1000 msnm, comprende cerca de 750 especies distribuidas en 50 géneros ⁽¹⁾.

El cacao es una especie nativa del bosque húmedo tropical del noreste de América del Sur, de la región amazónica, de climas cálidos principalmente. Es un árbol pequeño que crece de 3 a 6 metros de altura, aunque puede alcanzar alturas hasta de 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa; prefiere regiones húmedas y es una especie de interés agroindustrial, por ser base de la economía nacional en los países procesadores como Venezuela, Perú, Brasil y Colombia ⁽²⁾.

Adriazola (2003), indica la siguiente clasificación taxonómica:

Nombre científico: *Theobroma cacao* L.; **Nombre común:** Cacao; **Origen:** América Latina; **Reino:** Vegetal (Plantae); **Orden:** Malvales; **Clase:** Dicotiledóneas; **Familia:** Esterculiaceae; **Tribu:** Birtheriaceae; **Género:** Theobroma; **Especie:** *Theobroma cacao* L.; **División:** Spermatophyta; **Subdivisión:** Angiosperma ⁽³⁾.

Otros autores refieren que esta especie vegetal pertenece a la familia **Malvaceae**; en Cuba, algunos la consideran dentro de una familia Malvaceae expandida, subdividida en nueve subfamilias ^(4, 5). El objetivo del artículo es proponer una práctica de laboratorio para las carreras de Química Industrial y Agropecuaria de la UCP "Enrique Jose Varona", La Habana, Cuba.

DESARROLLO

Las cáscaras de cacao se obtienen cuando los granos son separados de la vaina. El grano de cacao es utilizado principalmente para la fabricación del chocolate; sin embargo, en el beneficio y procesamiento del grano se generan residuos, tales como cáscaras, cascarillas y efluentes de fermentación, que representan hasta el 74-86% (en peso) de la mazorca ⁽⁶⁾.

Las cáscaras de cacao son ricas en carbohidratos, fibra, proteínas, pectina y compuestos bioactivos (por ejemplo, los polifenoles y carotenoides) ⁽⁷⁾. La cascarilla

del grano del cacao generado en los procesos agroindustriales representa el 12% del peso en grano seco ⁽⁸⁾.

El alto porcentaje de residuos de cacao, hace de estos un problema ambiental y fitosanitario en las plantaciones de cacao, pero teniendo en cuenta sus niveles nutricionales estos residuos pueden ser empleados para obtener productos con un alto valor agregado; entre los que se destacan los polifenoles y la fibra que se posicionan muy bien en los mercados actuales ⁽⁹⁾.

Otro factor determinante en la calidad del cacao, es el procesamiento al que son sometidos, primero los frutos (principalmente tiempo de almacenamiento) y posteriormente las almendras, ya que se ha demostrado el efecto que puede ejercer el procesamiento poscosecha, principalmente la fermentación, el secado y tostado de las almendras que promoverán la transformación, disminución o síntesis de moléculas que han de contribuir con las características sensoriales y que determinan la calidad o defectos en los cacaos ^(10, 11).

Dentro de los componentes químicos que se encuentran en los productos de los árboles de cacao, sus semillas y cáscaras, se reporta la teobromina que pertenece a una clase de moléculas alcaloides conocidas como metil-xantinas, las cuales se producen de forma natural hasta en 60 diferentes especies de plantas y también incluyen a la cafeína (la principal metil-xantina del café) y teofilina (la principal metil-xantina del té) ⁽¹²⁾.

Esta planta no está considerada como planta con propiedades medicinales dentro de la flora cubana, aunque se le atribuyen ciertas propiedades como por ejemplo la teobromina como tónico cardíaco, la manteca grasa semisólida de sus semillas para untar en los labios cuarteados por el frío y para preservar el cutis contra los efectos del sol. Esa manteca es emoliente. Igualmente se usa la manteca de cacao, tópicamente, contra las grietas de los pechos de las mujeres que están criando, y en supositorios contra las almorranas ^(13, 14).

Para el desarrollo de las actividades prácticas los estudiantes deben revisar los siguientes aspectos:

1. Núcleos estructurales de los alcaloides y propiedades de los mismos.
2. Métodos de separación (extracción).

3. Ensayos para su reconocimiento.

4. Interés farmacéutico.

Parte experimental

Material vegetal

La muestra utilizada consiste en la cascarilla de los granos (almendra) de cacao tostado, la cual debe ser secada después de su separación de los frutos. La misma será suministrada por la Fábrica de Chocolates de Baracoa, Provincia de Guantánamo. Después de su recolección la cascarilla es envasada en bolsas de nylon sin eliminarse las materias extrañas. El molinado se efectúa en un molino de martillo de alta velocidad hasta alcanzar un tamaño de partículas de 200 micras de diámetro. La muestra conservará su color carmelita y un agradable olor a chocolate (Figura 1).



Figura 1. Semillas de cacao tostadas, cascarilla y droga pulverizada

Elaboración de los extractos

Procedimiento # 1:

Los extractos se preparan con el material vegetal molinado, realizándose tres extracciones sucesivas con 60 g de droga y 675 mL de etanol al 90 % en un extractor Soxhlet durante 20 horas. Los diferentes extractos obtenidos se concentran en evaporador rotatorio hasta 200 mL para recuperar el disolvente utilizado, a 120 rpm, a 70 °C y una presión de 500 mbar ⁽¹⁵⁾.

Procedimiento # 2:

Después de la extracción, el extracto concentrado se mantiene en reposo sobre la mesa del laboratorio durante varios días, al cabo de los cuales se observa la aparición de un precipitado sólido de color crema-amarillento que se recupera por filtración o

decantación, cuyo rendimiento de extracción debe ser de 1 g aproximadamente (Figura 2).



Figura 2. Precipitado sólido del extracto de EtOH 90 % de la cascarilla

Análisis por CCD, UV e IR

La cromatografía de capa delgada (CCD) se realiza con placas pre-elaboradas sobre soporte de papel de aluminio con gel de sílice G.60 F-254 de la Merck, utilizando como disolvente de elución una mezcla (v/v/v) de n-butanol: ácido acético: agua 4:1:5, donde se corre el extracto total y el sólido recuperado (cristalizado).

Se disuelve una fracción de la muestra del sólido insoluble en una mezcla de EtOH/HCl (conc) en un tubo de ensayo calentando y después de homogenizar la mezcla se le añaden unas gotas de reactivo de Dragendorff. Se observará si aparece un cambio de coloración hacia el rojo vino intenso. Este resultado demuestra la presencia de compuestos de naturaleza alcaloidal.

La corrida cromatográfica del sólido insoluble se realiza sobre placa de sílicagel G.60 F-254 de la Merck, utilizando como disolvente de elución una mezcla de CHCl_3 : MeOH: n-propanol: Agua (5:6:1:4). Se realizará la observación al visible y con vapores de NH_4 . Posteriormente se realiza otra corrida cromatográfica sobre el mismo soporte, pero utilizando como fase móvil una mezcla de CHCl_3 : MeOH (7:3). La placa se observa al visible y se revela con H_2SO_4 y calor.

La espectrometría UV se realiza en metanol con un espectrofotómetro UV-VIS, utilizando para la determinación un rango de escaneo de 200 a 500 nm de longitud de onda y una absorbancia de 0.000-3.000, todos en cubetas de cuarzo, con una banda espectral de 1.5 nm y una resolución espectral de 0.1 nm.

El registro de los espectros IR se realiza en un equipo con un rango de escaneo entre 7500-360 cm^{-1} , sobre tabletas de bromuro de potasio (KBr), resolución de 2 cm^{-1} , con un diodo laser 850 nm (Laser Clase 1).

Nota: El modelo de equipo UV o IR puede variar de acuerdo a las posibilidades de cada centro. No es necesario cumplir con este requisito por razones obvias, pero si es imprescindible que se cumplan los parámetros que se relacionan para cada tipo de corrida.

Análisis por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La muestra se someterá a un análisis cromatográfico utilizándose para ello un equipo de CG-EM marca Shimadzu QP2010, equipado con spittler split/splitless, con una columna capilar BP5 (30 x 0,25 mm x 0,25 μ), bajo las siguientes condiciones cromatográficas: gas portador Helio, los fragmentos se obtendrán por la técnica de impacto electrónico a 70 eV, flujo 1,2 mL/min, flujo 1:50, y volumen de inyección de la muestra 1 μ L. Temperatura del horno programada: inicial 70 $^{\circ}\text{C}$, rampa de calentamiento 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 300 $^{\circ}\text{C}$, permaneciendo estable esta temperatura por 10 minutos. Subsecuentemente la temperatura se incrementa a un rango de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 300 $^{\circ}\text{C}$. Tiempo de corrida 78 minutos. Temperatura del inyector 250 $^{\circ}\text{C}$. Los compuestos serán analizados utilizando las cartotecas o librerías del propio equipo NIST21 y NIST 107. El agente sililante utilizado es el *N,O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (**BSTFA**) CAS 25561-30-2 Lote: 0901-1 Macherey-Nagel GmbH & C. KG.

Cada extracto o muestra sólida se evapora a sequedad y se aplica el derivatizante. En caso de que las señales presentaran escasa visualización se redisuelven con acetronitrilo (ACN) más el derivatizante.

Nota: El modelo de equipo de CG-EM y la columna pueden variar de acuerdo a las posibilidades de cada centro. No es necesario cumplir con este requisito por razones obvias, pero si es imprescindible que se cumplan los parámetros que se relacionan para cada tipo de corrida. El derivatizante puede ser sustituido por otro de los reportados por la literatura para estos fines.

Análisis cromatográfico del extracto etanólico (CCD)

El análisis por cromatografía de capa delgada del extracto etanólico, bajo las condiciones descritas anteriormente, se efectúa utilizando como disolvente de elución una mezcla de

n-butanol-ácido acético-agua (65:25:10) v/v/v/, conocido comúnmente como BAW, y como patrones de referencia la rutina y la quercetina.

Visible

El extracto mostrará la presencia de manchas de color crema claro indefinidas. La segunda mancha (**Rf 0,55**) está prácticamente a la misma altura de la mancha que desarrolla la muestra patrón del glucósido flavonoide rutina (Figura 3).

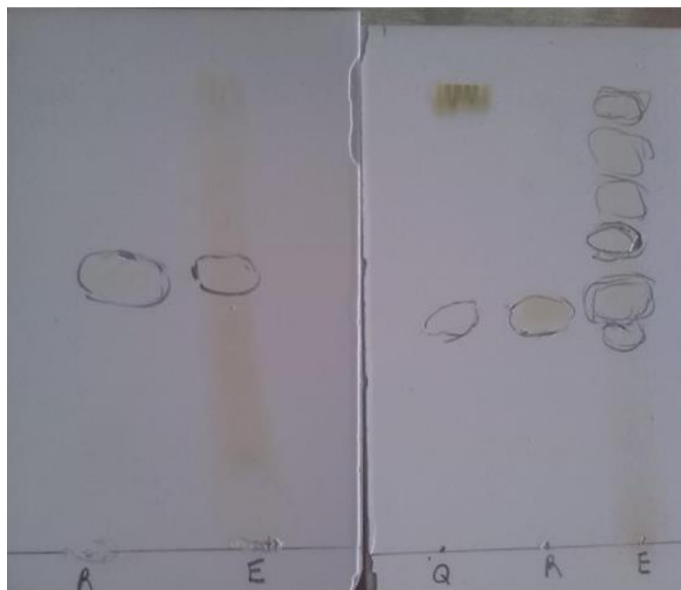


Figura 3 .CCD del extracto etanólico al 90 % de la cascarilla al visible UV 254 nm

El extracto mostrará cambios de coloración en las manchas. La 1 de (**Rf 0,45**) de color amarillo claro, al igual que la 4 (**Rf 0,75**). La segunda presenta una mancha de color amarilla oscura con un (**Rf 0,55**) a la misma altura de la mancha de la rutina. La 3 tiene color verde azul oscuro (**Rf 0,60**). La mancha 4 de color amarillo con **Rf 0,65**. La 5 con (**Rf 0,75**) presenta también color amarillo. La 6 presenta también coloración amarilla con un (**Rf 0,86**) mientras que la séptima mancha que está cercana al frente del disolvente será de color amarillo-verdosa (**Rf 0,96**).

UV 365 nm

El extracto muestra una mancha (1) de color carmelita claro (**Rf 0,45**), la segunda mancha de color carmelita claro (**Rf 0,55**) que está a la misma altura de la rutina, la tercera mancha de color azul claro (**Rf 0,65**) típica de coumarinas, la cuarta mancha de color carmelita oscura (**Rf 0,75**), la quinta mancha de color carmelita claro (**Rf 0,86**) y la séptima de color carmelita oscuro (**Rf 0,96**).

Se puede inferir que existe posibilidad de presencia de al menos 5 compuestos relacionados con los flavonoides y uno con las coumarinas. Todos los detalles comentados se pueden observar en la Figura 4.

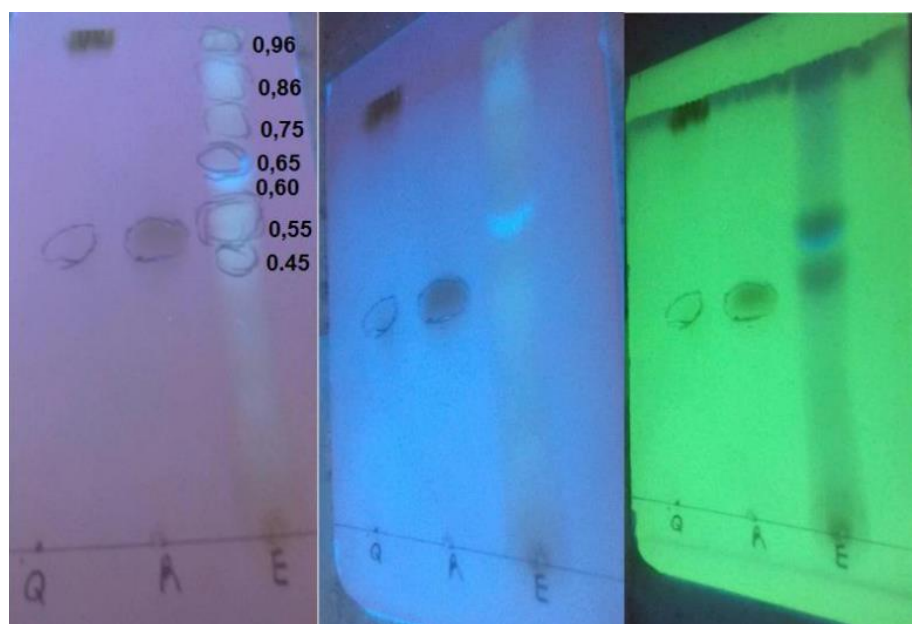


Figura 4. CCD del extracto etanólico al 90 % de la cascarilla (UV254 y UV366 nm)

Análisis cromatográfico del sólido precipitado del extracto etanólico (CCD)

La CCD de la muestra insoluble en el extracto etanólico al 90 % de la cascarilla del cacao después de redisolverse en la mezcla de EtOH/HCl_(conc) en un tubo de ensayo calentando hasta homogenizar permite definir la presencia de compuestos alcaloidales.

La corrida de la muestra punteada con la fase móvil CHCl₃: MeOH: n-propanol: Agua (5:6:1:4) permite observar al visible la presencia de una mancha crema-amarillenta situada en el frente del solvente, con un **Rf 0,85**. Al revelarse con vapores de NH₄ la mancha toma coloración amarilla clara.

La corrida realizada con la mezcla de CHCl₃: MeOH (7:3) permite observar al visible la presencia de una mancha crema-amarillenta situada en el frente del solvente, con **Rf 0,85**. Al revelarse con H₂SO₄ y calor se observan 6 manchas. De abajo hacia arriba, la primera de color rosado con **Rf 0,5**; la segunda de color rosado oscuro con **Rf 0,57**; la tercera de color morado con **Rf 0,64**; la cuarta de color verde con **Rf 0,71**; la quinta de color morado oscuro con **Rf 0,78** y la sexta de color carmelita oscuro con **Rf 0,85**, tal y como muestra la Figura 5.



Figura 5. CCD del sólido precipitado del extracto EtOH 90 %

Análisis cromatográfico (CCD) del sólido precipitado del extracto etanólico y del extracto etanólico al 90 % con patrones de cafeína y teofilina

Este procedimiento se realiza con el objetivo de definir la presencia o no en el extracto etanólico total al 90% y la muestra sólida insoluble obtenida de ese extracto después de varios días de mantenido en reposo en la mesa del laboratorio de los alcaloides cafeína y teofilina.

Los resultados alcanzados al utilizarse como fase móvil la mezcla de metanol: amoníaco al 25 % (100:1,5) permiten observar el desplazamiento de la muestra del extracto total al 90 % solamente, con una imagen alargada desde el punto de aplicación de esa muestra de color carmelita oscuro, con forma de espada de hoja ancha hacia la parte superior sin observarse otras manchas en las muestras del sólido insoluble ni de los patrones de cafeína y teofilina utilizados al respecto (Figura 6), que se torna brillante en la parte superior al ser expuesta bajo la luz UV a 366 nm.

Al realizarse la corrida cromatográfica con la mezcla de CHCl_3 : MeOH: n-propanol: agua (5:6:1:4) se observa que en el caso de la muestra del extracto total la imagen es alargada desde el punto de aplicación y más estrecha que la observada cuando se corrió con la fase móvil mencionada anteriormente, con los bordes brillantes cuando se expone bajo la luz UV a 366 nm, y apareciendo dos manchas brillantes con **Rf 0,93** tanto para la muestra del extracto total como para la de cafeína.

Esto permite inferir la presencia de este compuesto en los extractos totales, pero no en el sólido insoluble. No se evidencia la presencia de teofilina en ninguna de las dos muestras analizadas al respecto.

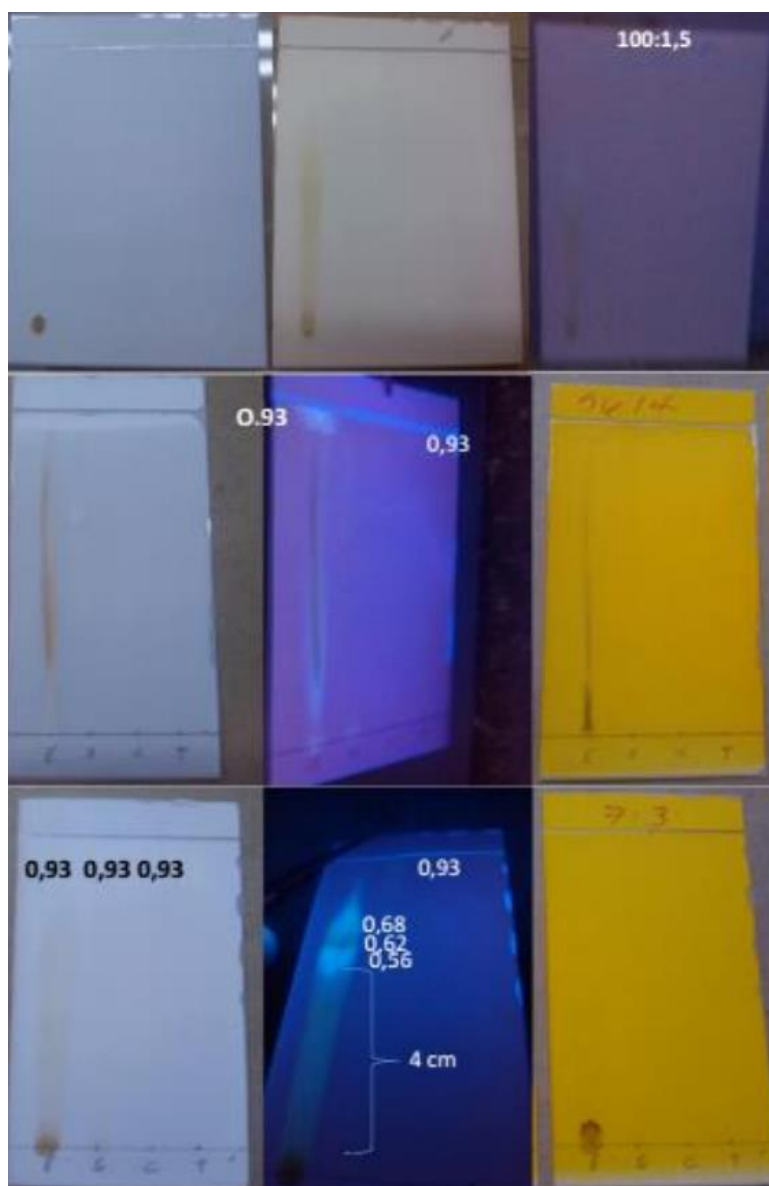


Figura 6. CCD del extracto y la muestra sólida insoluble para definir la presencia de cafeína y teofilina

Por último, cuando se utiliza como fase móvil la mezcla de CHCl_3 : MeOH (7:3) se aprecia al visible una mancha alargada desde el punto de aplicación mucho más ancha que en el caso anterior, con manchas de **Rf 0,93** para las aplicaciones del extracto total, la muestra sólida insoluble en etanol al 90 % y la de cafeína patrón.

Al exponerse bajo la luz UV a 366 nm presenta una imagen alargada de color verde amarillento de 4 cm de largo y tres manchas bien definidas con valores de **Rf 0,56** (color verde-amarillento brillante), **0,62** y **0,68**, respectivamente. La muestra sólida presenta

una mancha brillante con **Rf 0,93** que se corresponde con el *Rf* de la cafeína utilizada como patrón de referencia.

En todos los casos al visible la muestra del extracto etanólico al 90 % muestra una coloración carmelita oscura, idéntica a la del extracto original, tanto en el punto de aplicación como durante la corrida. No se evidencia la presencia de teofilina en ninguna de las dos muestras analizadas. Al revelarse las cromatoplasmas con el reactivo de Dragendorff y el de Ludy-Tenger desaparecen todas las manchas, excepto la del punto de aplicación y la corrida del extracto total.

CG-EM del extracto etanólico al 90%

El extracto etanólico al 90 %, así como, los extractos preparados por maceración durante el tamizaje fitoquímico, se someterán a un análisis por CG-ME según se describió en la metodología utilizada en la Parte Experimental ⁽¹⁶⁾.

Los perfiles cromatográficos de las cuatro muestras analizadas mostrarán la misma cantidad de componentes químicos con pocas diferencias hasta los 46 minutos de tiempo de retención, para la extracción con Soxhlet, el extracto hidroalcohólico y el etéreo, no así para el acuoso (Figura 7)

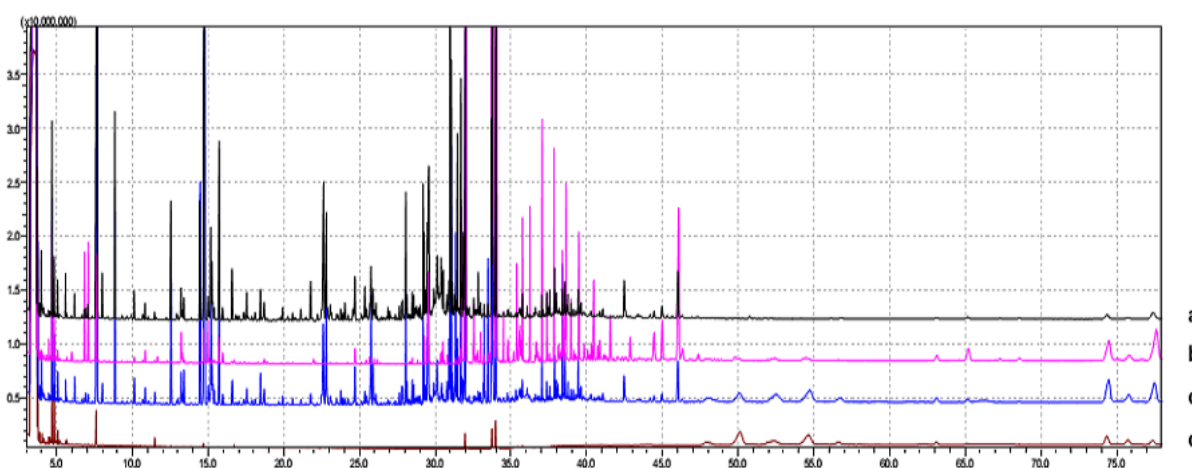


Figura 7. Perfiles cromatográficos de los extractos analizados por CG-EM. (a-Extracto EtOH 90 % Soxhlet; b-Ext. Hidroalcohólico; c-Ext. Etéreo; d-Ext. Acuoso)

De acuerdo al perfil cromatográfico del extracto acuoso, este fue el que menor cantidad de componentes químicos reportó, indicando que lo mismos presentan baja o mediana polaridad, aspecto contradictorio si se tiene en cuenta que el extracto acuoso fue el de mejor resultado en la determinación de sustancias solubles con 20,85 %.

Determinación del perfil cromatográfico del sólido precipitado del extracto etanólico por CG-EM

La muestra sólida se somete al análisis por CG-EM bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, siempre redisolviéndose en acetronitrilo y aplicando el agente derivatizante. El cromatograma registrado por el equipo que se muestra en la Figura 8 ilustra que no se observa abundancia de los picos cromatográficos y que los mismos no son prominentes. Los picos más significativos están alrededor de los 15 minutos y entre los 29 y 47 minutos de tiempo de retención.

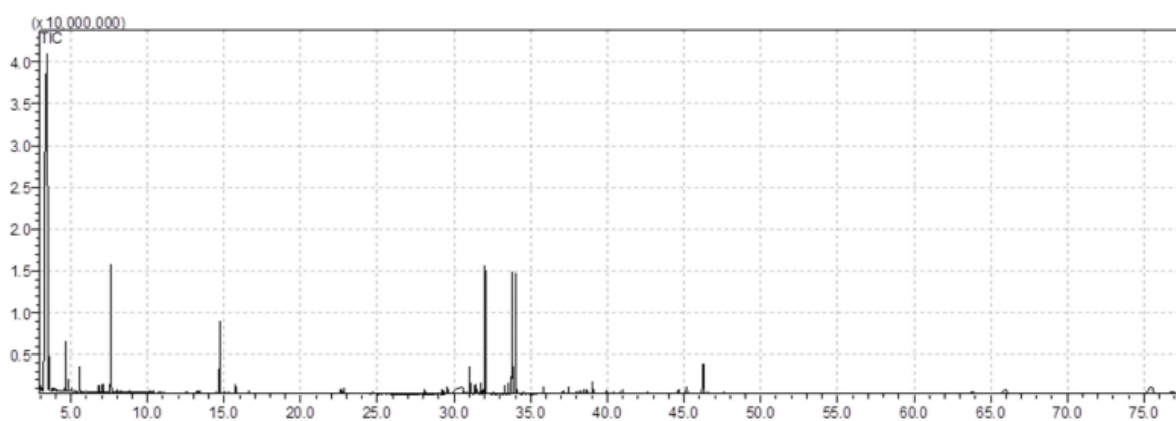


Figura 8. Perfil cromatográfico del sólido precipitado del extracto etanólico

El primer componente químico registrado es el trimetilsilil éter del glicerol a los 14,691 min de tiempo de retención, un compuesto relacionado con las grasas. El segundo a los 15,751 min es el ácido butanedioico (succínico), el tercer compuesto es la L-Prolina, 5oxo- (22, 633 min), butanal (22, 836 min), mio-inositol (29, 244min), ácido benzoico (29,743 min), cafeína (29,559 min), teobromina (30, 415 min), treitol (31, 026 min), Ribitol (31, 107 min), β -D-galactofuranosa (31, 504 min), ácido-D-arabinónico (31, 728 min), ácido dodecanoico (31,790 min), ácido hexadecanoico (32, 014 min), ácido octacosanoico (32, 614 min), ácido 9-octadecenoico (33, 287 min), ácido 9,12-octadecadienoico (33, 755 min), ácido oleico (33, 836 min), ácido octadecanoico (34,050 min), ácido eicosanoico (35, 828 min), ácido docosanoico (37, 447 min), ácido tetracosanoico (39,036 min), estigmasterol (45, 173 min), y el colesterol (46, 258 min).

Este resultado permite inferir la presencia de cafeína y teobromina en la muestra sólida insoluble que precipita del extracto total, pero no de teofilina como plantean varios autores al respecto. El patrón de fragmentaciones de la cafeína nos lleva a inferir que los dos alcaloides tienen un patrón de fragmentaciones similar a la encontrada en las cáscaras de cacao con CLAE aplicando diferentes métodos de extracción. Estos autores plantean además, que no se descarta la presencia y superposición de teobromina y teofilina debido a que pueden existir en mezcla con la cafeína ^(1,17, 18).

CONCLUSIONES

La CG-EM permite la identificación de varios componentes químicos presentes en la cascarilla del cacao entre los que se encuentran la cafeína y la teobromina, dos de las metilxantinas que han sido reportadas como componentes mayoritarios de *T. cacao* L. en el fruto, no así, la teofilina, aunque esto pudiera ser debido a los diferentes procesos por lo que atraviesa este subproducto para la elaboración del chocolate. Debido a la alta sensibilidad del método, otros constituyentes minoritarios pudieran ser también identificados. Se hace necesaria la utilización de nuevos estudios tales como la CLAR-UV-IEEI-EM/EM con un gradiente y eluentes diferentes y RMN de ¹H y ¹³C para la detección y caracterización estructural de estos y de otros compuestos minoritarios aún sin definir su elucidación estructural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cuéllar García OA. Obtención del Extracto Polar Etanol: Agua (1:1) de la Cáscara de Cacao y Evaluación de su Actividad Antibacteriana. Documento presentado como requisito parcial para optar al título de Tecnólogo Químico. Universidad Tecnológica de Pereira; 2010.
2. Salamanca Grosso G, Pérez Figueredo C, Zapata Rivera M, Osorio Tangarife M. Flora Apícola indicadora Departamento del Tolima. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima; 2004,
3. Adriaola O. Producción de los alimentos de los dioses (*Theobroma cacao* L.). UNAS. Tingo María-Perú; 2003.
4. Acevedo-Rodriguez P and Strong TM. Catalogue of Seed Plants of the West Indies. (Smithsonian contributions to botany; no. 98), 2012, p 524. Published by Smithsonian Institution Scholarly Press P.O. Box 37012, MRC 957 Washington, D.C; 2012.
5. Areces Berazaín F y Fryxell AP. Flora de la República de Cuba. Fascículo 13. Malvaceae; 2007.

6. Ortiz O, Villamizar R, and Rangel J. Applying life cycle management of colombian cocoa production. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2014; 34(1):62-68.
7. Pérez L y Pulido N. Determinación experimental y modelamiento de los perfiles de extracción supercrítica para la obtención de compuestos bioactivos a partir de cáscara de cacao (Clon CCN-51)"; Universidad Industrial de Santander: Bucaramanga, Colombia; 2014.
8. Murillo I, Quilambaqui M. Evaluación de 2 Dietas Experimentales con Diferentes Niveles de Cascarilla de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en las Fases de Crecimiento y Acabado de Cuyes (*Cavia porcellus* L.) de Raza Andina" (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica del Litoral; Guayaquil-Ecuador; 2008.
9. Trade Map (2016). Lista de los países importadores para el producto seleccionado en 2015. Octubre [En línea]. Disponible en: <http://www.trademap.org>.
10. Afoakwa E, Quao J, Takrama J, Budu A, Saalia F. Chemical composition and physical quality characteristics of ghanaiian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *J Food Sci Technol*. 2013; 50: 1097-1105.
11. Rodríguez-Campos J, Escalona-Buendía H, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores M. Dynamics of volatile and nonvolatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res Int*. 2011; 44: 250-258.
12. Vázquez-Ovando A, Ovando-Medina I, Adriano-Anaya L, Betancur-Ancona D, Salvador-Figueroa M. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2016; 66(3): 239-254.
13. Roig J. T. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editora Científico Técnica. La Habana; 2014.
14. Acosta LL y Rodríguez CA. Plantas Medicinales: Bases para su producción sostenible. Agrinfor, Impresiones MINAG; 2006.
15. González Yaque J, Max Monan, Julio Perez, Enrique Gómez, Damaris de la C. Salgado, Danae Pérez. Determination of Theobromine and Caffeine in *Theobroma cacao* Husk from Ethanolic Extract by GC-MS after CC separation; 2019
16. Pérez D, González J, Gómez E, Perez J, Rodriguez J. L, Monan M. Chemical characterization of metabolites from the husk of *Theobroma cacao* by GC-MS in Cuba. *Journal of Applied Biotechnology*. 2018 6(2): 39-48.
17. Lijun Wang and Curtis Weller. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006; 17: 300–312.
18. Al-Qaim F, Yuzir A y Mussa Z. Determination of theobromine and caffeine in some Malaysian beverages by liquid chromatography-time-of flight mass spectrometry. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 2018, 17 (3): 529-535.

BIBLIOGRAFÍA

Farmacopea de los Estados Unidos de América. 35 Revisión. 2012. 1260: Twinbrook Parkway. Rockville. MD 20852

Pengelly A. The Constituents of Medicinal Plants. 2nd Edition. Purine Alkaloids; 2002.

Sherma J and Fried B. Handbook of Thin-Layer Chromatography. Third Edition, Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, New York, NY 10016, 2005.

WHO. Quality control methods for medicinal plant material. Geneva; 1998.

Recibido: 19 de junio de 2019

Aceptado: 7 de setiembre de 2019