



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**



**CHILATE: OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LIC. DE QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**LILIANA SOTO ROMERO**

**DIRECTOR: DR. CARLOS A. GÓMEZ ALDAPA**

**CO DIRECTOR: DRA. BETSABÉ HERNÁNDEZ SANTOS**



**M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,**  
**DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR**  
**DE LA U.A.E.H.,**  
**Presente:**

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Liliana Soto Romero**, quien presenta el trabajo de investigación "**Chilate: obtención, caracterización y evaluación de su capacidad antioxidante**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente	<b>Dr. Santiago Ricardo Tomás Filardo Kerstupp</b>	
Primer vocal	<b>Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa</b>	
Segundo vocal	<b>Dra. Esmeralda Rangel Vargas</b>	
Tercer vocal	<b>Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés</b>	
Secretario	<b>Dr. Javier Castro Rosas</b>	
Primer suplente	<b>Dra. María Luisa Rodríguez Marín</b>	
Segundo suplente	<b>Dra. Betsabé Hernández Santos</b>	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE  
 "Amor, Orden y Progreso"  
 Pachuca Hidalgo, 7 de enero de 2016.

**Dr. Gian Arturo Álvarez Romero**  
 Coordinador Adjunto de la Licenciatura de  
 Química en Alimentos

Ciudad del Conocimiento  
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5  
 Colonia Carboneras  
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184  
 Tel. +52 771 7172000 exts. 2200 y 2201, Fax 6502  
 aaq\_icbi@uah.edu.mx



## **AGRADECIMIENTOS**

*LAS PRUEBAS TE HACEN FUERTE, LAS PENAS TE HACEN HUMANO, LOS FRACASOS TE HACEN HUMILDE, Y EN TODO MOMENTO, DIOS SE MANTIENE A TU LADO.*

A MIS PADRES MISAEL SOTO OCÁDIZ Y LUCILA ROMERO ROJO, A MIS HERMANAS FER Y CITLALLI Y A MI ABUELITA EMMITA QUE ME CUIDA DESDE EL CIELO. GRACIAS POR EL APOYO QUE ME HAN BRINDADO DURANTE TODA MI VIDA, YA QUE SIN ÉL Y SIN SU CONFIANZA NO HABRÍA LLEGADO HASTA DONDE ME ENCUENTRO AHORA, CULMINANDO ESTA ETAPA TAN IMPORTANTE DE MI VIDA. ESTE ESFUERZO ES PARA USTEDES. A MI TÍA MALENA POR LA IDEA DEL CHILATE Y POR TODO SU APOYO.

A MI AMIGO ELÍAS, POR ACOMPAÑARME A LO LARGO DE ESTA AVENTURA, POR ENSEÑARME QUE NO EXISTEN IMPOSIBLES Y POR BRINDARME UNA AMISTAD INCONDICIONAL. A JAQUELINE Y LAURITA POR SU APOYO Y POR HACER DE ESTE TIEMPO ALGO DIVERTIDO. A JOSÉ POR ESTAR A MI LADO CUANDO LO NECESITO Y POR RECORDARME EL VALOR DE LA AMABILIDAD Y EL RESPETO. A MIS COMPAÑERAS DE LABORATORIO Y AMIGAS PERLA, ENAIM Y HEIDI, POR TODO SU APOYO Y CONSEJOS LLENOS DE SABIDURÍA Y EXPERIENCIA. Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE ME APOYARON EN EL TRABAJO DE LABORATORIO.

A MIS DIRECTORES DE TESIS, EL DR. CARLOS A. GÓMEZ ALDAPA Y LA DRA. BETSABÉ HERNÁNDEZ SANTOS, POR TODO EL APOYO, LA PACIENCIA Y LA CONFIANZA QUE ME BRINDARON PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO. A LA DRA. CECILIA E. MARTÍNEZ SÁNCHEZ POR SU APOYO Y AMABILIDAD DURANTE TODA MI ESTANCIA. AL DR. JESÚS RODRÍGUEZ MIRANDA POR APOYARME EN LA PARTE EXPERIMENTAL DEL PROYECTO.

A ESAS PERSONAS QUE EL DESTINO PUSO EN MI CAMINO PARA APOYARME EN TODO MOMENTO DE MANERA DESINTERESADA Y QUE ADEMÁS ME BRINDARON UNA AMISTAD SINCERA, LA CUAL VALORO MUCHO: LEYLA, LUZ, CARO, LUIS Y A LA SEÑORA CELI.

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO, AL INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA, POR BRINDARME EL HONOR DE SER ORGULLOSAMENTE UNIVERSITARIA. AL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTEPEC, POR ABRIRME SUS PUERTAS Y FACILITARME MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PARTE EXPERIMENTAL DE ESTE PROYECTO.

## RESUMEN

Actualmente, México tiene una de las más altas prevalencias de sobrepeso y obesidad en niños y adultos, considerando como uno de los principales factores el consumo de productos industrializados, los cuales son de alta energía y de bajo costo, además de que estos alimentos y bebidas tienden a ser muy altos en sodio y azúcares. En este proyecto se analizaron diferentes muestras de una bebida típica del estado de Guerrero, llamada Chilate (muestra elaborada artesanalmente, muestra comercial en polvo, muestra comercial líquida) y se compararon entre sí, con la intención de valorar su aporte nutricional y medir su capacidad antioxidante bajo diferentes condiciones de almacenamiento, con la intención de presentar esta bebida como una alternativa saludable y rescatar los alimentos tradicionales del país. Esta bebida está hecha a partir de cacao, arroz, canela y azúcar, los cuales son molidos para elaborar una pasta cremosa, que es la base de la bebida. Mediante una prueba de análisis sensorial se determinó una formulación con una reducción de 100 g de azúcar, que puede sustituir a la formulación original, sin modificar el sabor de la bebida, ya que, según los resultados obtenidos en dicha prueba, la cantidad de azúcar genera diferencias significativas en la aceptación del sabor. Se realizó el análisis químico proximal (AQP) de la formulación original, la nueva formulación y a la muestra comercial en polvo, además se calculó el aporte calórico de las dos primeras, dando como resultado un total de 163 kcal y 162 kcal en una porción de 250 mL, respectivamente. Después se determinó el contenido de polifenoles y flavonoides totales y se midió la capacidad antioxidante por dos métodos: 2,2-difenil-1-picrilhidrailo (DPPH+) y la inhibición de la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL). Las muestras fueron tomadas cada tercer día de la pasta hecha con la nueva formulación, almacenada bajo dos diferentes condiciones: en refrigeración (R) (6°C) hasta el día 13 y a temperatura ambiente (TA) (18°C) hasta el día 5, la muestra comercial en polvo (CP) se mantuvo en refrigeración (6°C) hasta el día 11, de la muestra comercial líquida (CL), solo se tomó una muestra directa de la botella, la cual se encontraba en refrigeración, se utilizó como control el extracto de semillas de cacao (CACAO). En cuanto al contenido de polifenoles, el control fue el que

presentó mayor concentración  $1179.53 \pm 3.99$  eqAG/g, en la muestra (TA), presentó una disminución en la concentración de polifenoles de  $43.50 \pm 0.26$  a  $4.50 \pm 0.03$  eqAG/g de muestra seca del día 0 al día 5, la muestra (R) reportó variaciones en el contenido de polifenoles durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo no hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la concentración del día 0 y el día 13 ( $44.86 \pm 0.10$  y  $43.50 \pm 0.26$  eqAG/g de muestra seca, respectivamente). En cuanto a la muestra (CP), fue la que presentó mayor concentración de polifenoles en el día 0 y el 11 ( $121.08 \pm 0.87$  y  $170.12 \pm 0.44$  eqAG/g de muestra seca, respectivamente), la muestra (CL) presentó la menor concentración de polifenoles ( $2.11 \pm 0.06$  eqAG/g de muestra seca). El orden descendiente de las concentraciones obtenidas de flavonoides totales fue: CACAO > CP > R > TA > CL, con concentraciones de:  $603.69 \pm 1.85$  ECA/g de muestra seca para la primera, la segunda presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones del día 0 y el día 11 ( $40.25 \pm 0.19$  y  $49.04 \pm 0.12$  ECA/g de muestra seca, respectivamente), la tercer muestra no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la concentración inicial (día 0) y la final (día 13) ( $20.54 \pm 0.66$  y  $22.00 \pm 0.17$  ECA/g de muestra seca, respectivamente), la cuarta muestra presentó diferencia significativa en la concentración inicial (día 0) y la final (día 5) ( $20.54 \pm 0.66$  y  $2.17 \pm 0.15$  ECA/g de muestra seca, respectivamente) y la última muestra presentó la concentración más baja ( $1.30 \pm 0.0$  ECA/g de muestra seca). En cuanto a la capacidad antioxidante fue el control el que presentó mayor actividad de captura del radical DPPH  $18.30 \mu\text{g/mL}$  (CE50), aun así, no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la muestra R, la cual reportó una CE50 de  $29.18 \mu\text{g/mL}$  y  $29.86 \mu\text{g/mL}$  para los días 0 y 13, respectivamente y con la muestra TA se obtuvo una CE50 de  $29.18 \mu\text{g/mL}$  y  $31.60 \mu\text{g/mL}$  para el día 0 y día 5, respectivamente. La muestra CP no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad antioxidante entre los días 0 a 7 (CE50 =  $467.66 \mu\text{g/mL}$  y  $661.22 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), pero del día 9 al 11 (CE50 =  $860.40 \mu\text{g/mL}$  y  $1127.83 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) presentó una disminución de la actividad antioxidante al final del monitoreo. La muestra CL fue la que presentó menor actividad antioxidante con una CE50 de  $3105.74 \mu\text{g/mL}$ . Según los resultados obtenidos en el ensayo de la inhibición de peroxidación lipídica, la muestra R inhibió el 50% de la oxidación con

una CI50 de 5.45  $\mu\text{g/mL}$  en el día 0 y 6.60  $\mu\text{g/mL}$  para el final del tiempo de almacenamiento, la muestra TA presentó una disminución de la actividad antioxidante del día 0 al día 5 (CI50 = 5.45  $\mu\text{g/mL}$  y 7.31  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). El control presentó una actividad menor que las muestras anteriores 6.80  $\mu\text{g/mL}$  (CI50). En el caso de las muestras CP y CL se observó un porcentaje de inhibición de oxidación lipídica del 95% a una concentración de 100 ppm, desafortunadamente no se pudo determinar la CI50. Cabe mencionar que es mejor la capacidad antioxidante de un extracto, cuando requiere de una menor concentración para alcanzar un mayor porcentaje de inhibición de la oxidación de la LDL. Se concluyó que la cantidad de azúcar influye significativamente en el sabor del chilate. También se puede considerar al chilate como un alimento completo, ya que tiene un aporte de proteínas, grasa, fibra cruda y carbohidratos. También se observó una reducción en el aporte calórico de la formulación elegida en la prueba sensorial, que es menor, incluso que la muestra de chilate líquida comercial y de los refrescos y bebidas azucaradas, principalmente consumidas en México y en cuanto a la capacidad antioxidante, se observó que la pasta contiene un alto contenido de polifenoles y una buena capacidad antioxidante en comparación con las muestras comerciales de chilate, al igual que se comprobó que las mejores condiciones para la conservación de la capacidad antioxidante de la pasta es a temperatura de refrigeración.

## ABSTRACT

Currently Mexico has one of the highest prevalences of overweight and obesity in children and adults, whereas one of the main factors the consumption of industrialized products, which are high energy and low-cost addition to these foods and beverages tend to be very high in sodium and sugar. In this project different a typical drink of the State of Guerrero called Chilate specimens were tested (sample handcrafted, shows commercial powdered, commercial sample liquid) and are compared against each other, intending to evaluate its nutritional contribution and measure their antioxidant capacity under different conditions of storage, with the intention of presenting this drink as a healthy alternative and rescue the traditional foods of the country. This drink is made from cocoa, rice, cinnamon and sugar which are ground to make a creamy paste that is the base of the drink. A formulation with a reduction of 100 g of sugar that can replace the original without changing the taste of the drink, since according to the results of such a test, the amount of sugar generates significant differences in acceptance of the flavor was determined by sensory analysis test. Proximal chemical analysis (AQP) was performed in the original formulation, the new formulation and to powder sample, was also calculated the energy intake for the first two giving as a result a total of 163 kcal and 162 kcal in a 250 mL serving respectively. After it was determined the contents of total flavonoids and polyphenols and measured the antioxidant capacity by two methods: 2, 2-diphenyl-1-picrilhidrailo (DPPH) and inhibition of the oxidation of low density lipoprotein (LDL). The samples were taken every other day of the pasta with the new formulation stored under two different conditions: to cooling (R) (6° C) until day 13 and at room temperature (TA) (18° C) until day 5, sample powder (CP) remained in refrigeration (6° C) until day 11, commercial sample liquid (CL) only took a direct sample of the bottle which was in cooling, the cacao (CACAO) seed extract was used as control. The polyphenols content control was which presented higher concentration  $1179.53 \pm 3.99$  eqAG/g, in the sample (TA), showed a decrease in the concentration of polyphenols of  $43.50 \pm 0.26$  to  $4.50 \pm 0.03$  eqAG/g of dry sample from day 0 to day 5, shows it (R) reported variations in the content of polyphenols during the storage time, however there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the concentration of day 0 and day 13 ( $44.86 \pm 0.10$  and  $43.50 \pm 0.26$  eqAG/g of dry sample) respectively. In terms of the sample (CP) was which presented higher concentration of polyphenols on the day 0 and day 11 ( $121.08 \pm 0.87$  and  $170.12 \pm 0.44$  eqAG/g of sample dry respectively), sample (CL) presented the lowest concentration of polyphenols ( $2.11 \pm 0.06$  eqAG/g of dry sample). The descending order of the concentrations obtained from total flavonoids was: CACAO > CP > R > TA > CL, with concentrations:  $603.69 \pm 1.85$  ECA/g of sample dry for the first, the second showed significant difference ( $p < 0.05$ ) between the concentrations of day 0 and day 11 ( $40.25 \pm 49.04$  and  $0.19 \pm 0.12$

ECA/g of sample dry respectively), third sample presented no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the initial concentration (day 0) and the final (day 13) ( $20.54 \pm 22.00$  and  $0.66 \pm 0.17$  ECA/g of sample dry respectively) , the fourth show presented significant difference in the initial concentration (day 0) and the final (day 5) ( $20.54 \pm 0.66$  and  $2.17 \pm 0.15$  ECA/g of sample dry respectively) and the last sample submitted the lowest concentration ( $1.30 \pm 0.0$  ECA/g of dry sample). As regards antioxidant capacity was control who presented greater activity of capture from the radical DPPH  $18.30 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{EC}_{50}$ ), yet not presented significant difference ( $p < 0.05$ ) with respect to the sample R, which reported an  $\text{EC}_{50}$  of ( $29.18$  and  $29.86 \mu\text{g/mL}$ ) for days 0 and 13 respectively and with sample TA was an  $\text{EC}_{50}$  of ( $29.18 \mu\text{g/mL}$  y  $31.60 \mu\text{g/mL}$ ) for the day 0 and day 5 respectively. Sample CP presented no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the antioxidant activity between 0 to 7 days ( $\text{EC}_{50}$   $467.66 \mu\text{g/mL}$  and  $661.22 \mu\text{g/mL}$  respectively), but the day 9 to 11 ( $\text{EC}_{50}$   $860.40 \mu\text{g/mL}$  and  $1127.83 \mu\text{g/mL}$  respectively) it showed a decrease of antioxidant activity at the end of the monitoring. Sample CL was that presented lower antioxidant activity with an  $\text{EC}_{50}$  of  $3105.74 \mu\text{g/mL}$ . According to the results obtained in the trial of the inhibition of lipid peroxidation, the sample R inhibited 50% of oxidation with an  $\text{IC}_{50}$  of  $5.45 \mu\text{g/mL}$  on day 0 and  $6.60 \mu\text{g/mL}$  for the end of the storage time, TA sample showed a decrease of antioxidant activity from day 0 to day 5 ( $\text{IC}_{50}$   $5.45 \mu\text{g/mL}$  and  $7.31 \mu\text{g/mL}$  respectively). The control presented one activity less than previous samples  $6.80 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{IC}_{50}$ ). In the case of samples CP and CL were a percentage of inhibition of lipid oxidation of 95% at a concentration of 100 ppm unfortunately we could not determine the  $\text{IC}_{50}$ . It is worth mentioning that it is better the antioxidant capacity of a summary when require a lower concentration to reach a higher percentage of inhibition of LDL oxidation. It was concluded that the amount of sugar significantly influences the taste of the chilate. The chilate can also be considered as a complete food because it makes a contribution of proteins, fat, crude fiber and carbohydrates. It was also noted a reduction in the intake of the chosen formulation in the sensory proof, which is lower than even that sample of commercial liquid chilate and soft drinks and sugary drinks consumed mainly in Mexico and in terms of the antioxidant capacity was observed that the paste contains a high content of polyphenols and a good antioxidant capacity compared with commercial samples of chilate , to found the best conditions for the conservation of the antioxidant capacity of the pasta is at cooling temperature.



# INDICE

	Pág.
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 CAMBIOS EN LA ALIMENTACIÓN MEXICANA</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 ÉPOCA COLONIAL .....	4
2.1.2 ÉPOCA ACTUAL .....	4
<b>2.2 SITUACIÓN ALIMENTARIA EN MÉXICO</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ALIMENTACION DE LA POBLACIÓN MEXICANA .....	5
2.2.2 ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA ALIMENTACIÓN .....	7
2.2.3 PARTICIPACIÓN DE LAS BEBIDAS EN LA DIETA EN MÉXICO .....	10
<b>2.3 ALIMENTOS FUNCIONALES</b> .....	<b>14</b>
2.3.1 ORIGEN .....	14
2.3.2 CONCEPTO .....	15
2.3.3 COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	18
2.3.4 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS .....	18
2.3.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	25
<b>2.4 CHILATE COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES</b> .....	<b>31</b>
2.4.1 PROPIEDADES DE LOS INGREDIENTES DEL CHILATE .....	32
2.4.1.1 POLIFENOLES EN CACAO .....	32
2.4.1.2 FACTORES QUE AFECTAN A LOS POLIFENOLES EN CACAO Y PRODUCTOS DE CACAO .....	34
2.4.1.3 POLIFENOLES EN ARROZ .....	35
2.4.1.4 POLIFENOLES EN CANELA .....	36
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>38</b>

<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	OBJETIVO GENERAL .....	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>44</b>
5.1	MATERIALES .....	44
5.2	MÉTODOS.....	44
5.2.1	PREPARACIÓN ARTESANAL DEL CHILATE .....	44
5.2.2	ANÁLISIS SENSORIAL.....	45
5.2.3	ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (AQP) .....	46
5.2.4	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	46
5.2.4.1	ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	46
5.2.4.1.1	DESENGRASADO DE LAS MUESTRAS .....	47
5.2.4.1.2	EXTRACCIÓN DE FENOLES.....	48
5.2.4.2	CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES.....	48
5.2.4.3	DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES.....	49
5.2.4.4	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE VÍA EL BLANQUEAMIENTO DEL RADICAL DPPH*.....	49
5.2.4.5	INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LDL.....	50
5.2.4.5.1	OBTENCIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO .....	50
5.2.4.5.2	PRECIPITACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD .....	50
5.2.4.5.3	ENSAYO DE OXIDACIÓN DE LAS LDL.....	50
5.2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	51
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>55</b>
6.1	ANÁLISIS SENSORIAL .....	55
6.2	ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (AQP).....	55
6.3	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	63
6.3.1	CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES .....	63
6.3.2	CUANTIFICACIÓN TOTAL DE FLAVONOIDES.....	66
6.3.3	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	67
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad, de la ENN-1999, ENSANUT-2006 y ENSANUT-2012, por sexo, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS. México	8
2	Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años de edad, de la ENSANUT-2006 y ENSANUT-2012, por sexo, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS. México	8
3	Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adulta de 20 años y más, de la ENSANUT-2006 y ENSANUT-2012, por sexo. . México	9
4	Proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes por sexo y edad. México, ENSA 2000, ENSANUT 2006 y 2012	10
5	Prevalencia de hipertensión arterial por sexo y años de encuesta. México, ENSANUT 2006 y 2012	11
6	Tendencias en el consumo de bebidas per cápita por grupo comparando los años 1999 y 2012	13
7	Tendencias en ventas diarias del volumen total per cápita de refresco de cola en los años 1999–2012	14
8	Algunos compuestos bioactivos en alimentos, clasificados según su naturaleza química	19
9	Clasificación de las familias de los compuestos fenólicos	21
10	Clasificación de flavonoides	21

11	Estructura básica de los flavonoides	22
12	Diastereoisómeros	22
13	Dímeros típicos de procianidinas, trímero y teaflavina	23
14	Principales antocianidinas	24
15	Captadores de radicales libres	26
16	Estructura química del ácido tánico	27
17	Chilate	32
18	Comparación entre chilate en pasta y chilate en polvo	62
19	Contenido total de fenoles	65
20	Contenido total de flavonoides	67
21	Concentración eficiente ( $CE_{50}$ ) para la inhibición del radical DPPH de las muestras de chilate	68
22	Concentración de Inhibición de la oxidación de las LDL ( $CI_{50}$ ) de las muestras de chilate	70

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Ingredientes para la elaboración del chilate formulación original	45
2	Formulaciones de chilate	45
3	Metodologías del Análisis Químico Proximal	47
4	Datos de ordenamiento tabulados en la prueba de aceptabilidad	56
5	Diferencia entre total de pares	57
6	Análisis Químico Proximal de los ingredientes del chilate	58
7	Composición de la pasta de chilate formulación original	59
8	Composición de la pasta de chilate formulación reducida en azúcar	60
9	Información nutricional del chilate formulación original	60
10	Información nutricional del chilate formulación reducida en azúcar	61
11	Análisis Químico Proximal de la pasta de chilate en polvo	62



# **INTRODUCCIÓN**

## 1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la población mexicana busca consumir platillos de preparación rápida, sin estar conscientes de la calidad del alimento, lo que está asociado con la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) en el país. Estas enfermedades se asocian a un alto consumo de carbohidratos simples y a una baja ingesta de antioxidantes en la dieta, ya que un alto contenido de radicales libres en el ser humano acarrea desordenes metabólicos de muy alto impacto, dando origen a enfermedades como diabetes e hipertensión. Por otro lado, existen bebidas originarias de México como el *chilate* que pueden ser beneficiosas para a la salud, pero el poco conocimiento de estas en otras partes del país impide su consumo. El *chilate* es una bebida de consumo común en el estado de Guerrero y es preparada a base de una pasta hecha con ingredientes naturales, que son cacao, arroz, canela y azúcar, siendo algunos de ellos de gran interés por su alto contenido de compuestos fenólicos, que son los responsables de la capacidad antioxidante. No se han encontrado documentos que avalen el estudio de esta bebida como tal, por lo que es importante hacer un análisis de su aporte nutricional y de los beneficios que pueda aportar a la salud con enfoque en su actividad antioxidante. Se debe tomar en cuenta que esta actividad se ve afectada por el proceso de producción, el tiempo y las condiciones de almacenamiento, tales como la temperatura, lo que modifica la calidad de los compuestos fenólicos y por lo tanto su capacidad antioxidante. Por lo anterior, mediante ensayos *in vitro*, se midió la capacidad antioxidante y se monitoreó su comportamiento durante un lapso de tiempo, bajo diferentes temperaturas de tres muestras diferentes de *chilate*: la primera fue de la pasta hecha artesanalmente, la segunda fue de pasta deshidratada comercial y la tercera de una muestra líquida comercial.



## **MARCO TEÓRICO**



## **2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 CAMBIOS EN LA ALIMENTACIÓN MEXICANA**

#### **2.1.1 ÉPOCA COLONIAL**

A partir de la conquista española, en 1521 d.C; sobrevino una serie de eventos de carácter sociodemográfico y económico que dieron lugar a la explotación de los recursos naturales y de los recursos humanos, la enajenación de la cultura indígena y la imposición del estilo de vida europeo, con las ya consabidas fatalidades, mermas y tragedias descritas en la historia (Escalante et al., 2004).

El intercambio de productos alimenticios entre los españoles colonizadores y los indígenas Mexicanos, creó la cocina mestiza, que es la combinación de las aportaciones americanas, preparadas a la manera española; y de los ingredientes europeos (españoles), cocinados a la manera indígena. De ese modo surgió la cocina típica mexicana que se ha llegado a integrar con pescados y animales mexicanos, la carne de los animales traídos de España y de sus colonias, plantas y frutos de ambos países, salsas, dulces y bebidas (García, 2006).

Conforme fueron pasando los años, las bebidas típicas regionales fueron modificándose al empezarse a utilizar nuevos cultivos como café y caña de azúcar, esto generó una nueva gama de productos que comenzaron a sustituir a las bebidas ya existentes, probablemente a esto se debe la falta de registros del tipo de bebidas, su preparación y su origen (García, 2006).

Se generalizó el uso de la manteca de puerco y el aceite de olivo, así como se introdujeron vinos y la destilación de productos derivados del agave. A esto se añadió la influencia asiática proveniente de China, que venía de Manila y que introdujo hierbas y especies, tan saboreadas en nuestros platillos. En esta etapa se inició la cocina novohispana, la cual se fraguó principalmente en las cocinas de los virreyes y en los conventos (Román et al., 2013).

#### **2.1.2 ÉPOCA ACTUAL**

Al estallar la revolución mexicana en 1910, se generaron nuevos cambios en la sociedad, con la fallida reforma agraria, la economía familiar se transformó de estar

basada en la producción de bienes del campo a un salario obtenido de la industria manufacturera; lo que impulsó a la población rural a migrar a las ciudades, originando cambios en la dieta (Novo, 2010; Román et al., 2013).

Estos cambios se vieron aún más afectados en la época de los noventas, cuando el sector agropecuario sufrió una crisis, como resultado de la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) y de una política agropecuaria lesiva al campo mexicano y a sus productores. A todo esto, se agrega la incidencia de condiciones climatológicas adversas, como la sequía que afectó a vastas zonas del norte del país (Calderón, 2004).

Con la entrada en vigor del TLCAN, el mercado interno de productos agropecuarios sufrió una transformación radical, ya que México se convirtió en abastecedor de productos agropecuarios para el mercado externo, dejando de lado al interno y trastocando con ello el abasto alimentario nacional (Soria y Palacios, 2014). La situación de alimentación en el país fue cada vez más complicada, ya que según resultados de la Encuesta Nacional de Ingreso y Gasto de los Hogares de 2012, conforme al ingreso en las zonas urbanas, el 67% del gasto fue destinado a la compra de alimentos, bebidas y tabaco, mientras que para las zonas rurales fue del 69%. Esto se vuelve un serio problema para las familias rurales, ya que, por un lado, los ingresos son más bajos que en la ciudad y por el otro, el incremento en el precio de la canasta básica, ya que el Índice Nacional de Precios al Consumidor de 2010-2013, mostró un incremento de 3.4% para los precios de la canasta básica y un 4.1% en general en los productos del rubro de alimentos, bebidas y tabaco.

## **2.2 SITUACIÓN ALIMENTARIA EN MÉXICO**

### **2.2.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ALIMENTACION DE LA POBLACIÓN MEXICANA**

Según la Encuesta Nacional de Salud 2012, un 41.6% de la población experimenta inseguridad alimentaria leve, es decir, que experimenta preocupación por el acceso a los alimentos e inclusive podría sacrificar la calidad de la dieta familiar, el 17.7% se clasificó en inseguridad moderada, lo que significa que su dieta es insuficiente en

cantidad, y el 10.5% mantiene inseguridad severa, que implica que estos hogares han experimentado hambre, debido a la falta de dinero u otros recursos.

Es necesario considerar que el consumo alimenticio en México, se encuentra inmerso dentro de múltiples factores, por ello, el disponer de un acceso apropiado a ciertos alimentos, no necesariamente es el reflejo de una buena nutrición, cada día se generan cambios en los hábitos alimenticios: alimentos que originalmente se consumían en las localidades con altos contenidos nutricionales, sobre todo en vegetales, han sido sustituidos por productos que se consiguen en tienditas locales o supermercados (Soria, 2014; Palacios, 2014).

Según un estudio realizado por Camarena et al. (2011), en donde se encuestaron a consumidores mayores de 20 años de edad, elegidos al azar en 3 ciudades del estado de Sonora, para conocer los motivos y las características de compra y consumo que influyen en la búsqueda de mayor variedad alimentaria, se reportó que los consumidores que comen fuera de su casa menos de tres veces al mes, representan el 49.9% de la muestra total y los que lo hacen con frecuencia (más de tres veces al mes) representan el 50.1%. Estas características revelan una alta frecuencia de consumo fuera del hogar, lo que en buena medida puede llevar a un mayor contacto o degustación de alimentos nuevos, que muchas veces no cumplen con el requerimiento nutrimental. También se observó que el 45% de los encuestados se situó en el segmento tendiente a una mayor búsqueda de nuevos alimentos, este grupo estuvo conformado por personas jóvenes, con un nivel de ingresos relativamente mayor, con estudios superiores y/o post-universitarios, que desempeñan en mayor medida ocupaciones de empleos calificados y de estudiantes. Lo anterior concuerda con lo publicado por Bertrán (2005), quien afirma que en la medida que la población tiene mayores recursos económicos, prefiere alimentos industrializados, a pesar de las ventajas que el contenido de nutrientes de la alimentación típica del país provee, lo que parece ser el resultado de la idea sistemática en la sociedad y en las políticas públicas en donde se pregona que, para mejorar y desarrollarse, es mejor dejar de ser indígena.

## **2.2.2 ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA ALIMENTACIÓN**

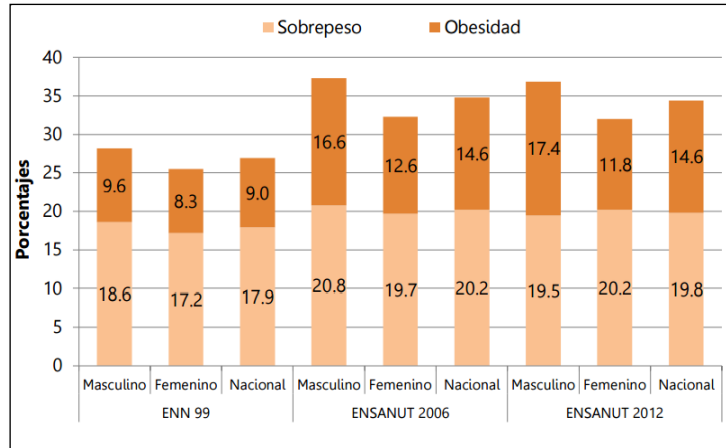
Las enfermedades crónico no transmisibles (ECNT), son un grupo heterogéneo de padecimientos que contribuyen a la mortalidad, mediante un pequeño número de desenlaces (diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedad vascular cerebral). Los decesos son consecuencia de un proceso iniciado décadas antes (Aguilar et al., 2005; mencionado por Cordova et. al., 2008).

### **2.2.2.2 OBESIDAD EN NIÑOS, ADOLESCENTES Y ADULTOS**

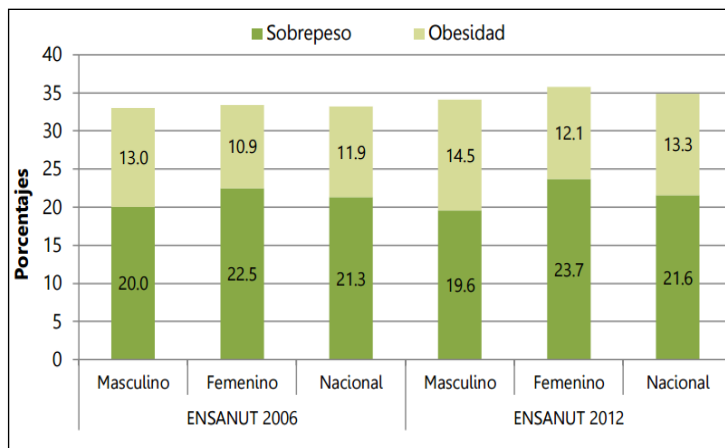
Datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2006), destacan el creciente índice de sobrepeso y de obesidad en la población mexicana, el cual se documentó como una epidemia. En la Figura 1 se muestran los resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición (ENN) realizada en 1999, en donde la prevalencia de sobrepeso y de obesidad representó el 26.9% (17.9% sobrepeso y 9.0% obesidad) en niños y niñas de entre 5 y 11 años, para el año 2006, hubo un aumento de 8 puntos porcentuales (pp) con respecto a la cifra anterior, reportando un total de 34.8% (20.2% sobrepeso y 14.6% obesidad) entre niños del mismo rango de edad, y para 2012 se registró un 34.4% de niños con sobrepeso.

En el año 2012, se reportó que el 34.9% de adolescentes mexicanos de entre 12 y 19 años de edad, tenían exceso de peso (como sobrepeso u obesidad). En 2006, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad bajo el mismo criterio de análisis fue de 33.2%, lo que representó un aumento de (0.28 pp/año). No se tiene información sobre el estado de nutrición de adolescentes varones en el año 1999, pero sí para adolescentes mujeres, de las cuales, el 28.3% presentó tener prevalencia combinada, sobrepeso y obesidad (Figura 2).

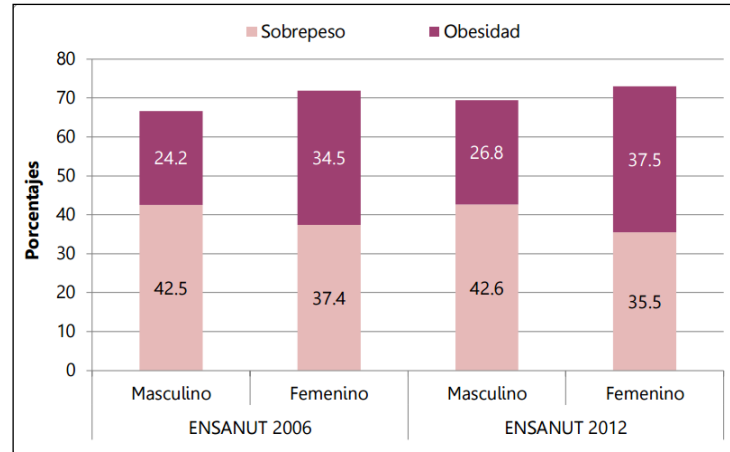
En cuanto a la población adulta, actualmente, 73 de cada 100 mujeres y 69 de cada 100 hombres adultos, presentan exceso de peso; es decir, la sumatoria de ambas categorías: sobrepeso y obesidad. Las cifras fueron ligeramente menores en el año 2006, con un total de 71.9% mujeres y 66.7% hombres (Figura 3).



**Figura 1** Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad, de la ENN-1999, ENSANUT-2006 y ENSANUT-2012, por sexo, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS. México. Fuente: INSP, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012



**Figura 2** Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años de edad, de la ENSANUT-2006 y ENSANUT-2012, por sexo, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS. México. Fuente: INSP, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2012



**Figura 3** Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adulta de 20 años y más, de la ENSANUT-2006 y ENSANUT-2012, por sexo. México. Fuente: INSP, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012

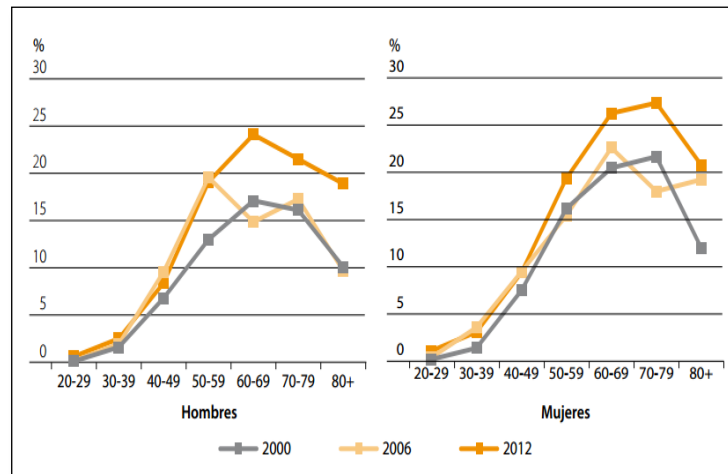
### 2.2.2.3 DIAGNÓSTICO PREVIO DE DIABETES

Es importante señalar que no se cuenta todavía con las cifras de medición de glucosa en la ENSANUT 2012, por lo cual, no es posible identificar con certeza si este hallazgo representa un incremento real, en prevalencia o un incremento ocasionado por mayores actividades de detección y por lo tanto, un aumento en la proporción de personas que se saben diabéticos. Sin embargo, este hallazgo es muy importante en términos de la demanda por servicios de salud, lo que es un indicativo de la gravedad del problema que representa la diabetes tipo 2 en México. La prevalencia de diabetes será reportada una vez que se cuente con el análisis del laboratorio de los sueros obtenidos de los participantes.

Los datos de la encuesta mostraron que la proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes, fue de 9.2%, esto es un incremento importante en comparación con la proporción reportada en la ENSA 2000 (5.8%) y en la ENSANUT 2006 (7%). Como se muestra en la Figura 4, al hacer las comparaciones por grupo de edad, para 2000, 2006 y 2012, tanto en hombres como en mujeres, se observó un ligero incremento en el diagnóstico médico previo de diabetes, conforme aumenta la edad, después de los 50 años este aumento fue mayor en 2012.

### 2.2.2.4 DIAGNÓSTICO PREVIO DE HIPERTENSIÓN

El reporte de hipertensión arterial considera la medición que se realizó en la ENSANUT 2006, y a la vez se analiza a la población que reportó haber recibido un diagnóstico previo de hipertensión por un médico, para aspectos relacionados con la atención de esta enfermedad.

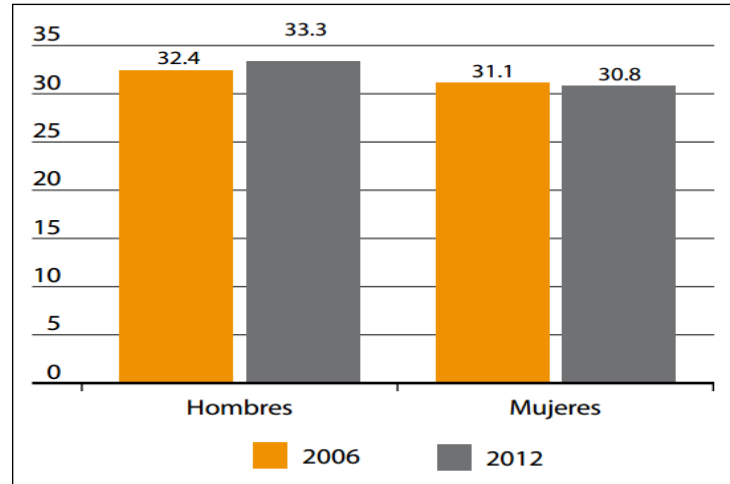


**Figura 4** Proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes por sexo y edad. México, ENSA 2000, ENSANUT 2006 y 2012. Fuente: INSP, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012

La prevalencia de hipertensión arterial obtenida de acuerdo con estos criterios se reporta en la Figura 5, donde se observa que se ha mantenido constante en los últimos seis años (ENSANUT 2006 y 2012), tanto en hombres (32.4 frente a 33.3%) como en mujeres (31.1 frente a 30.8%).

### 2.2.3 PARTICIPACIÓN DE LAS BEBIDAS EN LA DIETA EN MÉXICO

Se considera a la Inseguridad alimentaria como uno de los principales factores que puede aumentar el consumo de dietas de alta energía y de bajo costo, en las que no solo está el aporte de alimentos, sino también de bebidas, que tienden a ser muy altas en sodio y azúcar (Adrogué et al., 2007). Con este tipo de dietas se aumenta el riesgo de ganancia de peso excesivo, que a su vez aumenta el riesgo de diabetes tipo 2 e hipertensión (Pérez et al., 2012).



**Figura 5** Prevalencia de hipertensión arterial por sexo y años de encuesta. México, ENSANUT 2006 y 2012. Fuente: INSP, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012

Resultados de grandes estudios observacionales y ensayos clínicos, han encontrado un vínculo entre el consumo de bebidas endulzadas con azúcar y el aumento de peso, así como una asociación entre el consumo de este tipo de bebidas y una variedad de problemas cardiometabólicos (Stern et al., 2014). La obesidad abdominal ocupa un lugar principal en el origen del riesgo cardiometabólico y es la consecuencia de un balance energético positivo, que se debe a una ingesta calórica excesiva y una actividad física insuficiente (Grupo CONVERGE, 2007).

A nivel mundial, los productos de bebidas azucaradas han estado en constante aumento, debido a la rápida urbanización y a la fuerte comercialización en países de bajos y medianos ingresos (Yngve et al., 2012). México es el segundo mayor consumidor de refrescos en el mundo, además de que también se consumen aguas saborizadas endulzadas con azúcar, las denominadas "aguas frescas", la proporción de familias que adquieren refrescos, ha aumentado con los años, así como los mililitros *per cápita* consumidos (FEMSA, 2000).

Según datos reportados por Barquera et al. (2010), a nivel nacional, las calorías *per cápita* de bebidas se incrementó de 161 kcal en 1999, a 310 kcal en 2006, para niños en edad preescolar (1-4 años) y de 185 kcal a 323 kcal *per cápita*, desde 1999 a 2006, en niños en edad escolar (5-11 años), lo que representa una ingesta total de

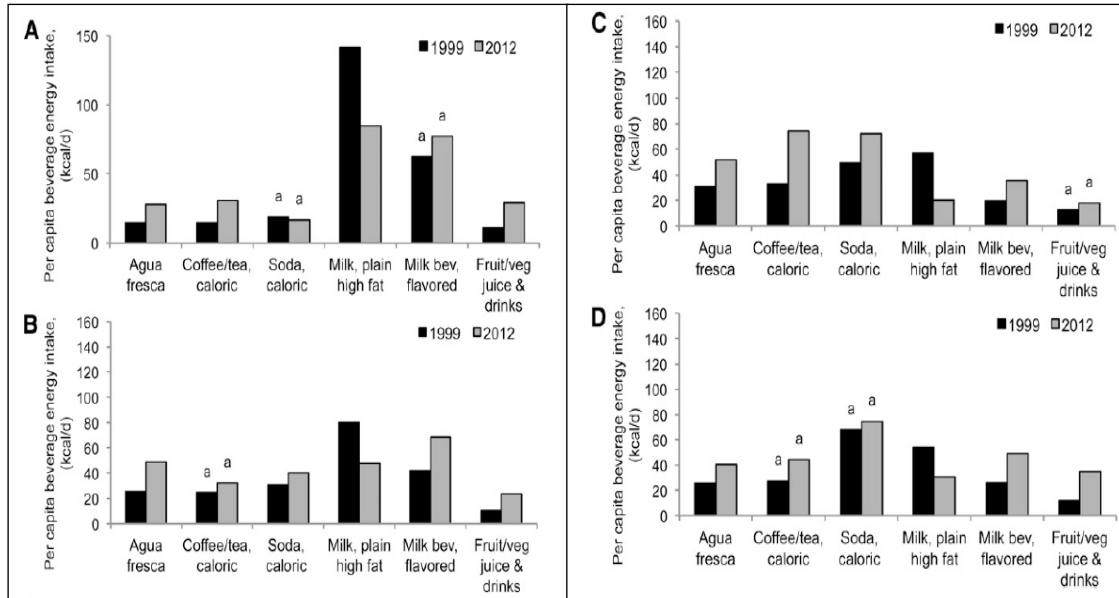


energía de 27.8 y 20.7%, respectivamente. La leche entera y las bebidas azucaradas son las que dan un mayor aporte de calorías en ambos grupos.

Ya que México, tiene una de las más altas prevalencias de sobrepeso y obesidad en niños y adultos, el gobierno implementó una serie de políticas y programas para frenar la creciente prevalencia de obesidad en México. En 2008, la Secretaría de Salud, estableció un grupo de expertos para elaborar recomendaciones sobre la ingesta de bebidas para una vida sana (Rivera et al., 2008). Basado en este informe, el gobierno hizo cambios extensos en sus programas de asistencia social, para reducir la leche entera a leche con un contenido de 1.5% de grasa. En 2010, el gobierno comenzó una iniciativa que en última instancia condujo a la eliminación de sales de sodio de todas las escuelas, aunque los niños pueden traer del hogar (Popkin et al., 2012) y en enero de 2014, instituyó un impuesto de 10% en cualquier bebida que contenga azúcares añadidos con excepción de la leche.

Stern et al. (2014), realizaron una comparación entre la ENN1999 y la ENSANUT 2012, para describir tendencias en el consumo y ventas de bebidas durante este periodo. Los resultados mostraron una disminución en la proporción de consumidores de agua y de leche con alto contenido de grasa entre niños de 1 a 11 años de edad y entre mujeres de 12-19 años, mientras que la proporción de consumidores de “aguas frescas” y refrescos calóricos aumentó marcadamente entre niños y adolescentes de 5-19 años, mientras que en mujeres de entre 20-49 años, aumentó la proporción de consumidores de agua fresca, café y té calóricos y leche saborizada durante el mismo período de tiempo (Figura 6).

Se muestra en la Figura 7 que desde 1999, las ventas de volumen *per cápita*, de refresco de cola regular carbonatada aumentó de 228 a 269 mL/d, mientras que las ventas de refresco de cola no carbonatada aumentaron de 86 a 103 mL/d. El refresco de cola carbonatada contribuyó al mayor volumen de ventas en México de 1999 a 2012. Las ventas de jugos y bebidas con sabor a fruta (< 25% zumo), casi se duplicó durante el mismo período de tiempo. La venta de refrescos de cola carbonatada baja en calorías, aumentó constantemente, mientras que las aguas embotelladas con sabor tuvieron un incremento proporcional en ventas desde 1999 a 2012.

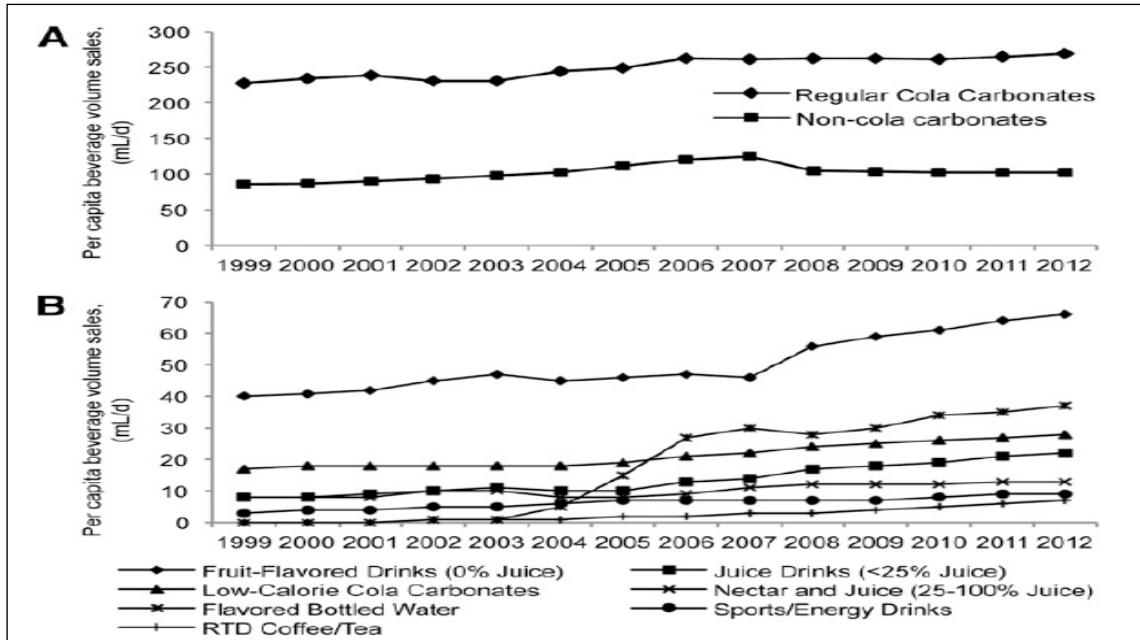


**Figura 6.** Tendencias en el consumo de bebidas per cápita por grupo comparando los años 1999 y 2012.

Niños de 1–4 años (A), niños de 5–11 años (B), mujeres de 12-19 años (C), mujeres de 20-49 años (D). Los valores representan las medias; n = 429-2751. Todos los datos se obtuvieron de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999 (n = 6049) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (n = 10.343). Las estimaciones con una letra en común difieren, (P<0.05) (Bonferroni's adjusted Student's t test). Bev: bebidas; veg: vegetales.

Fuente: Stern, et al., 2014.

Debido a que no se recolectaron datos para varones adultos en la ENN 1999, se desconoce si las mismas tendencias en el aumento de consumo de calorías por bebidas azucaradas ocurrieron en este grupo. En línea con informes anteriores sobre el consumo de bebidas en México (Barquera et al., 2008; 2010), estos resultados indican que las calorías de bebidas azucaradas, son actualmente, las principales fuentes calóricas en la población mexicana, por lo que es causa de preocupación entre todos los grupos de edad y género en México. Por lo tanto se espera que el consumo de bebidas comerciales con azúcar disminuya en respuesta al impuesto.



**Figura 7.** Tendencias en ventas diarias del volumen total per cápita de refresco de cola en los años 1999–2012.

Cola regular carbonatada y cola no calórica sin carbonatos (A) Bebidas calóricas y otras (B). Los valores representan total de ventas en volumen y no están vinculados a las personas. Todos los datos se derivan en el pasaporte del mercado Global de Euromonitor International. RTD, listo para beber.

Fuente: Stern, et al., 2014.

## 2.3 ALIMENTOS FUNCIONALES

### 2.3.1 ORIGEN

Siempre se ha sabido que la principal función de la dieta, es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas. Pero eso ya no basta, ya que ahora existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos, así como algunos de sus componentes, tienen efectos físicos y psicológicos benéficos, gracias al aporte de nutrientes básicos. Las investigaciones han pasado a centrarse más en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de mejorar las condiciones físicas y mentales, así como de reducir el riesgo a contraer enfermedades (Diplock et al. 1999).

El concepto de alimento funcional como tal, surgió en Japón a principios de los 80, debido al incremento gradual de ciertas enfermedades relacionadas con el estilo de

vida, la población empezó a darse cuenta de la importancia de mantener y cuidar su salud (Ohama et al., 2006). En 1991, el Ministerio de Salud y Bienestar de ese país, fue el pionero en publicar un reglamento, permitiendo legalmente la comercialización de algunos alimentos funcionales, en términos de “alimentos para uso específico en la salud” (Foods for specified health uses o FOSHU), refiriéndose a aquellos alimentos con componentes que desempeñen una función favorable y específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su aporte nutricional (Arai et al., 2001; Shimizu et al., 2003).

En 2001, el gobierno japonés amplió el rango de los FOSHU, añadiendo los complementos alimenticios en forma de cápsulas y comprimidos a los alimentos tradicionales, estableciendo así, una nueva legislación acerca de los “alimentos con alegaciones sanitarias” (Foods with health claims), los cuales incluyen a los FOSHU y los nuevos “alimentos con alegaciones nutricionales” (Foods with nutrient function claims o FNFC), como estos últimos, se ha homologado a 12 vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E, D, biotina, niacina, ác. pantoténico, y ác. fólico) y 2 minerales (hierro y calcio) (Shimizu, 2003). La alimentación funcional en Europa, inicia con un grupo de trabajo, promovido por la Sección Europea del International Life Sciences Intitute (ILSI), cuyo proyecto se tituló Functionals Food Science in Europe (FUFOSE), su objetivo era proponer una serie de conceptos y definiciones, con el fin de proporcionar bases y fundamentos apropiados para el futuro desarrollo científico de la alimentación funcional (Roberfroid, 2002).

### **2.3.2 CONCEPTO**

En 1999, el grupo del ILSI, definió un alimento como funcional, tomando en cuenta las siguientes características: Es un alimento funcional, aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable.

- ✓ Los alimentos funcionales no dejan de ser alimentos y deben demostrar sus efectos en las cantidades que se consideren normales para su consumo en la dieta: no se trata de pastillas o píldoras, sino que forman parte de los hábitos alimenticios normales
- ✓ Un alimento funcional puede ser natural o uno en el que un componente haya sido añadido/retirado tecnológica- o biotecnológicamente.
- ✓ Puede ser un alimento en el que la naturaleza o la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes, haya sido modificada, o cualquier combinación de estas posibilidades.
- ✓ Un alimento funcional puede serlo para todos los miembros de una población o para un grupo específico, que puede estar definido por su edad o constitución genética.

No se trata de una definición cerrada y definitiva, sino de una forma de escribir y delimitar convenientemente el concepto, de modo que permita trabajar científicamente sobre una base precisa (Roberfroid, 2002). Además de que también existe una serie de términos legales, cuyo ámbito se superpone con el de los alimentos funcionales, entre estos se encuentran (Kawak y Jukes, 2001):

Alimentos para uso dietético: Este término se refiere a aquellos alimentos que no forman parte de la dieta normal y que cumplen principalmente con dos características: i) son consumidos por un grupo específico de la población, debido a un estado físico o fisiológico y/o a una enfermedad o desorden determinados. ii) su composición debe diferir de un alimento tradicional. Se clasifican con los alimentos funcionales, si han sido específicamente formulados y/o proporcionan beneficios sobre la salud a una cierta población, más allá de sus valores nutricionales normales.

Alimentos medicinales: Se han formulado o procesado para incluirlos en dietas específicas de pacientes, los cuales deben ser usados solo bajo supervisión médica. Se distinguen de los alimentos funcionales, ya que a estos si se les permiten alegaciones sanitarias, referidas a una enfermedad o desorden específico.

Alimentos enriquecidos o fortificados: pueden considerarse como alimentos funcionales, si los nutrientes esenciales, son añadidos en los alimentos tradicionales,

con el objetivo de proporcionar beneficios sobre la salud, más allá de sus valores normales.

Alimentos saludables: son aquellos con reconocidas propiedades saludables y engloba a los alimentos naturales, es decir sin aditivos artificiales o muy poco procesados; ecológicos, cultivados en suelos orgánicos sin usar ningún tipo de sustancias agroquímicas o dietéticos, nutritivos como las bebidas para deportistas. De este modo, los alimentos funcionales son un tipo de alimentos saludables.

Nuevos alimentos: Aquellos que reúnan al menos una de las siguientes características:

- Transgénicos o que proceden de microorganismos modificados genéticamente.
- Poseen una estructura molecular distinta a la que presentaban con anterioridad.
- Proceden de microorganismos, algas u hongos, distintos de los empleados tradicionalmente en la elaboración de alimentos; de animales o vegetales, en cuya reproducción se emplean métodos no tradicionales.
- Se han obtenido mediante nuevos procesos de producción, que ocasionan modificaciones importantes de su composición o estructura, tales que afecten su valor nutricional, su asimilación por el organismo o la cantidad de sustancias no deseables que contienen. En general, cuando un alimento funcional sufre cambios sustanciales, en comparación con el alimento tradicional, se le considera nuevo alimento.

Nutracéutico: Término típico de las industrias farmacéutica y médica, que se refiere a los alimentos o parte de ellos, que proporcionan beneficios para la salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades. Este término engloba tanto a los complementos alimenticios, como a los alimentos funcionales.

Complementos alimenticios: se denomina así a “aquellos productos, cuyo fin sea suplementar la dieta normal, consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias, que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada [...] y que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias. Se distinguen claramente de los alimentos

funcionales, ya que son complementos de la alimentación y no sustitutos de ésta, siendo más parecidos a los medicamentos que a los alimentos tradicionales.

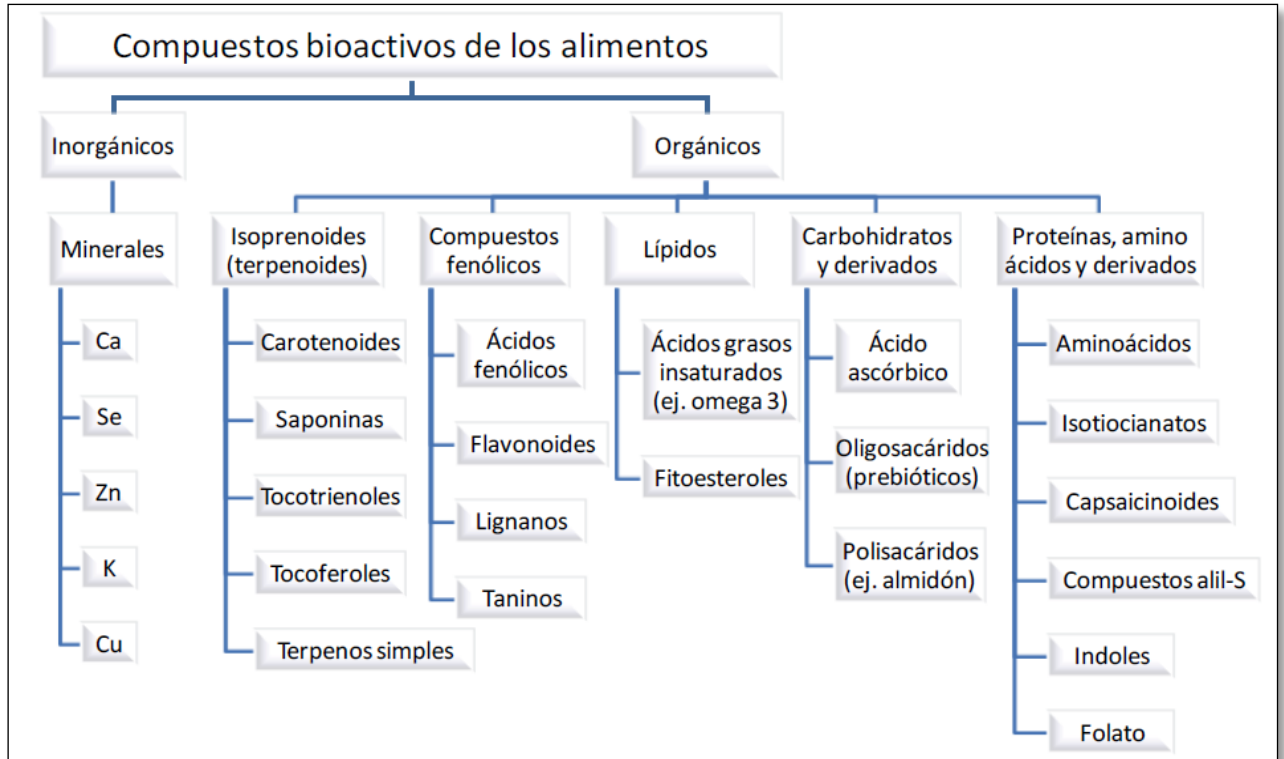
### **2.3.3 COMPUESTOS BIOACTIVOS**

Se pueden encontrar en los alimentos, dos tipos de nutrientes: macronutrientes, los cuales se requieren en mayor proporción (proteínas, carbohidratos y lípidos) y micronutrientes, necesarios en menor cantidad, pero fundamentales para el organismo, ya que intervienen en funciones vitales (vitaminas, minerales, ácidos grasos y aminoácidos). Sin embargo, la funcionalidad de un alimento está relacionada con alguno de sus componentes “no nutrientes”, estos son los “compuestos bioactivos” también llamados “fitoquímicos”, denominados así cuando se trata de compuestos de origen vegetal (Camara et al., 2003).

Los compuestos bioactivos, aunque no se consideran esenciales para la salud humana, poseen cierta actividad biológica dentro del organismo, que ayudan al bienestar del individuo y a disminuir el riesgo de padecer enfermedades, por lo que le confieren al alimento, características específicas que lo convierten en funcional (Gómez, 2010). En la Figura 8, se muestran algunos ejemplos de compuestos bioactivos, los cuales pueden clasificarse según su naturaleza química.

### **2.3.4 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, sintetizados por los vegetales, tanto en su desarrollo normal, como en respuesta a condiciones de estrés, contaminación del medio ambiente, radiaciones UV, temperaturas extremas, parásitos entre otras. La cantidad de compuestos fenólicos presentes en una planta, dependen de factores como especie o variedad, técnica y condiciones de cultivo, estado de maduración, así como de las condiciones de procesado (pelado, troceado, fritura, hervido) y almacenamiento entre otras, además de que su distribución en los tejidos a nivel celular y subcelular no es uniforme (Naczk y Shahidi, 2006).



**Figura 8** Algunos compuestos bioactivos en alimentos, clasificados según su naturaleza química. Fuente: Marti del Moral et al. 2005, tomado de Gómez, 2010.

Estos compuestos desempeñan importantes funciones morfológicas y fisiológicas, por ejemplo, en las plantas participan en las relaciones químicas entre la planta y su entorno, ya que son componentes de esencias y pigmentos en flores y frutos, confiriendo aromas y coloraciones (que favorecen la polinización, por ejemplo), sabores (principalmente amargos) y texturas (muchas veces desagradables que sirven como protección contra amenazas). Sirven también como protección, al acumularse en las capas superficiales de los vegetales, captando las radiaciones UV e impidiendo sus efectos nocivos en los tejidos internos (Bravo, 1998; Parr y Bolwell, 2002). Se encuentran en frutas, verduras, plantas medicinales, especias, legumbres, cereales, frutos secos, granos, semillas, chocolate y en bebidas como té, café, vino y cerveza, por lo que confieren características organolépticas a los alimentos y bebidas procedentes de plantas (Bravo, 1998; Pietta et al., 2003; Manach et al., 2004; Harnly et al., 2007). En humanos, su consumo, se ha asociado con efectos positivos para la salud, sobre todo por sus propiedades antioxidantes (Martínez et al., 2002). Su acción puede ser como: antialérgicos, antimicrobianos, cardioprotectores,



vasodilatadores, anticancerígenos, antitrombóticos entre otros (Yao et al., 2004; Scalbert et al., 2005).

### **2.3.4.1 CLASIFICACIÓN**

Dentro de este grupo, se encuentran alrededor de 8000 compuestos, con gran diversidad estructural, aunque todos deben poseer al menos un anillo fenólico, con uno o más grupos hidroxilo. Teniendo en cuenta el número de carbonos que los constituyen y la estructura del grupo fenólico, se pueden clasificar según su estructura (Bravo, 1998; Antolovich et al., 2000; Balasundram et al., 2006). En la Figura 9, se muestran las familias de los compuestos fenólicos.

#### **2.3.4.1.1 FLAVONOIDES**

Los más abundantes en la dieta, son los ácidos fenólicos y los flavonoides (30 y 60%, respectivamente), estos últimos se dividen en otras 13 clases (Bravo, 1998), las cuales se muestran la Figura 10. En la estructura común de los flavonoides, se encuentran dos anillos aromáticos (A y B) unidos por 3 átomos de carbono, que forman un heterociclo oxigenado (C) (Figura 11). Las diferentes clases de flavonoides difieren del nivel de oxidación y de los sustituyentes del heterociclo, mientras que los compuestos dentro de cada familia, difieren en los sustituyentes de los dos anillos aromáticos (Herrero et al., 2005).

##### **2.3.4.1.1.1 FLAVANOLES, PROANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANIDINAS**

Los flavanoles o flavan-3-ols, son comúnmente llamados catequinas. A diferencia de los flavonoides, en la estructura de los flavanoles no existe un doble enlace entre C2 y C3, así como tampoco hay un grupo carbonilo en el C4 del anillo C. La hidroxilación en el C3, permite a los flavanoles tener dos centros quirales en su molécula (en C2 y C3) y por lo tanto, cuatro diastereoisómeros posibles. La catequina es el isómero de configuración trans y la epicatequina es de configuración cis. Cada una de estas dos configuraciones tiene dos estereoisómeros, es decir, (+)-catequina, (-)-catequina, (+)-epicatequina, y (-)-epicatequina (Figura 12) (Tsao, 2010).

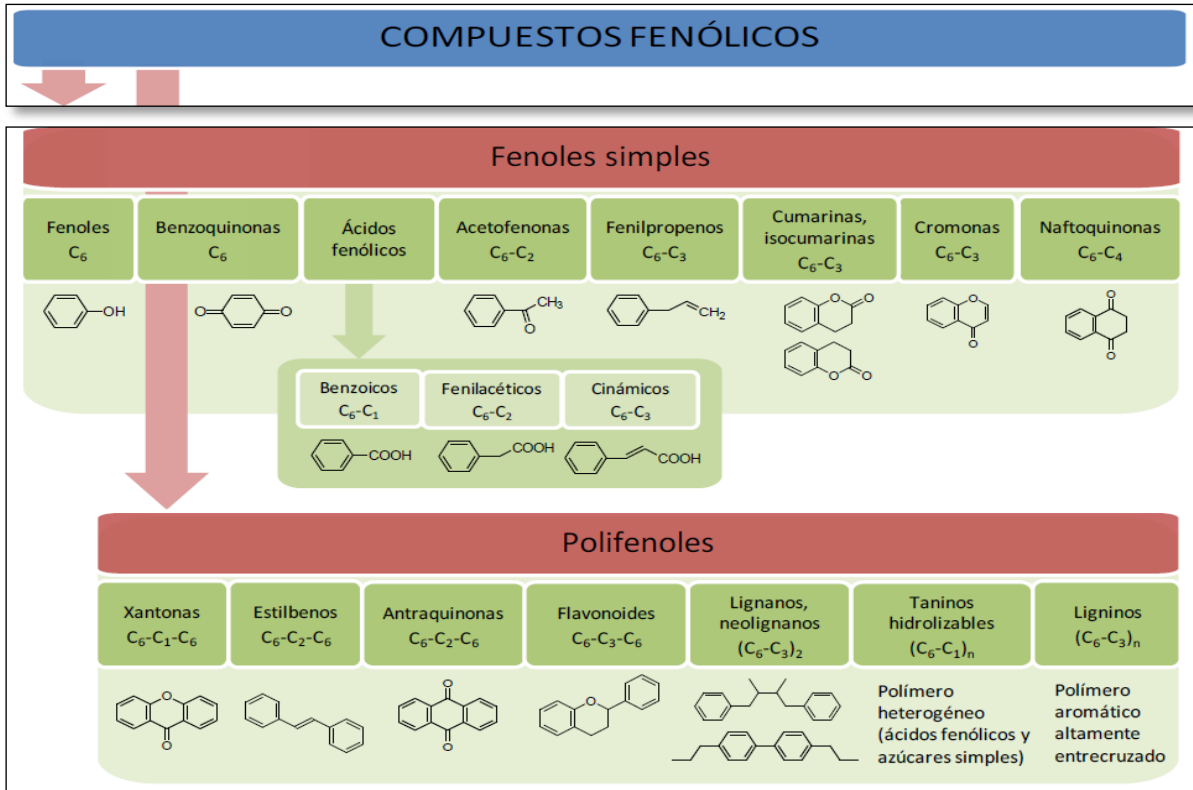


Figura 9 Clasificación de las familias de los compuestos fenólicos. Fuente: Gómez, 2010

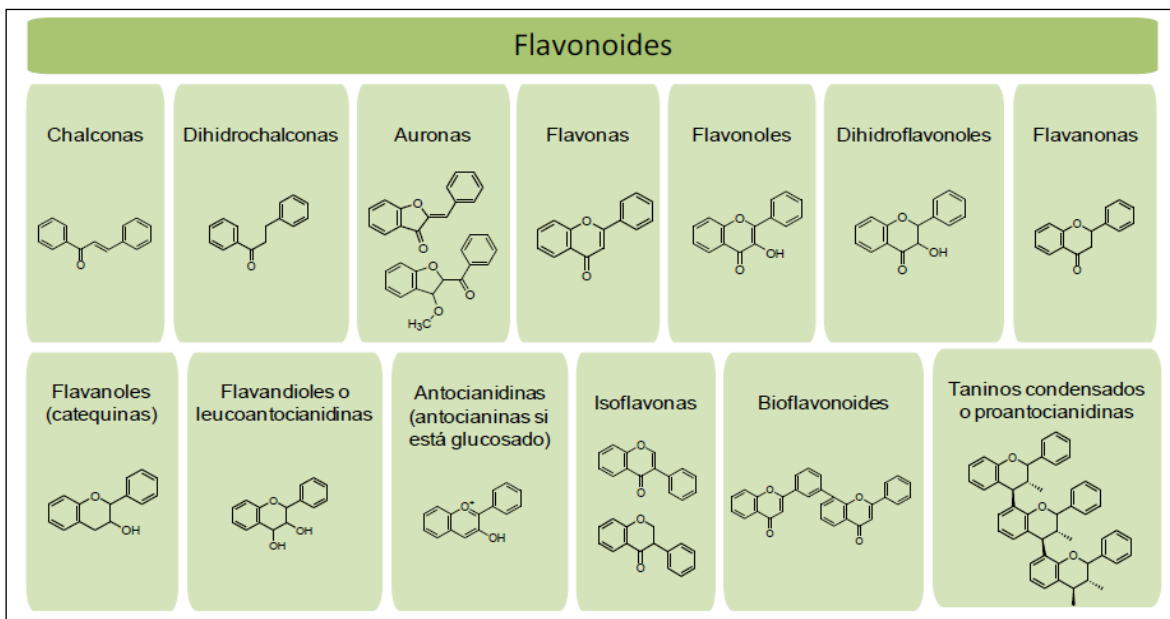
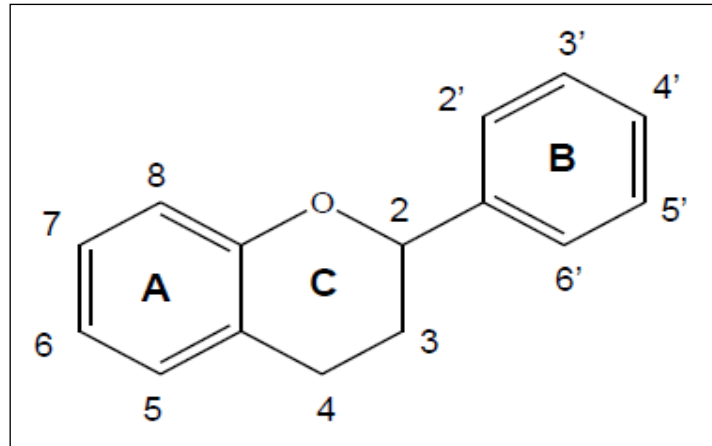
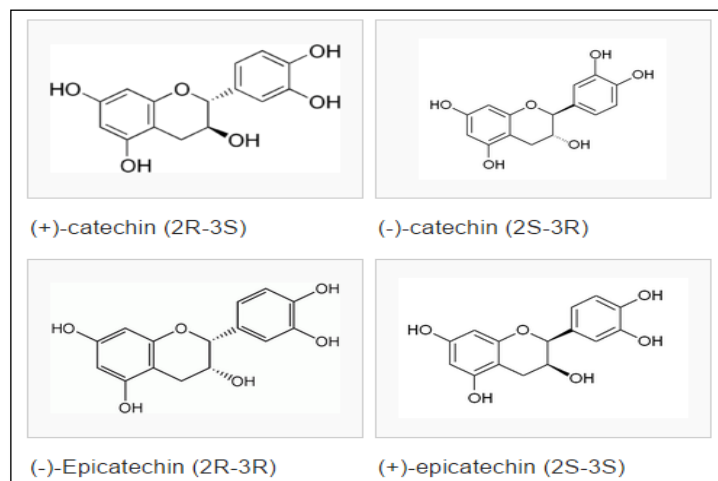


Figura 10 Clasificación de flavonoides. Fuente: Gómez,

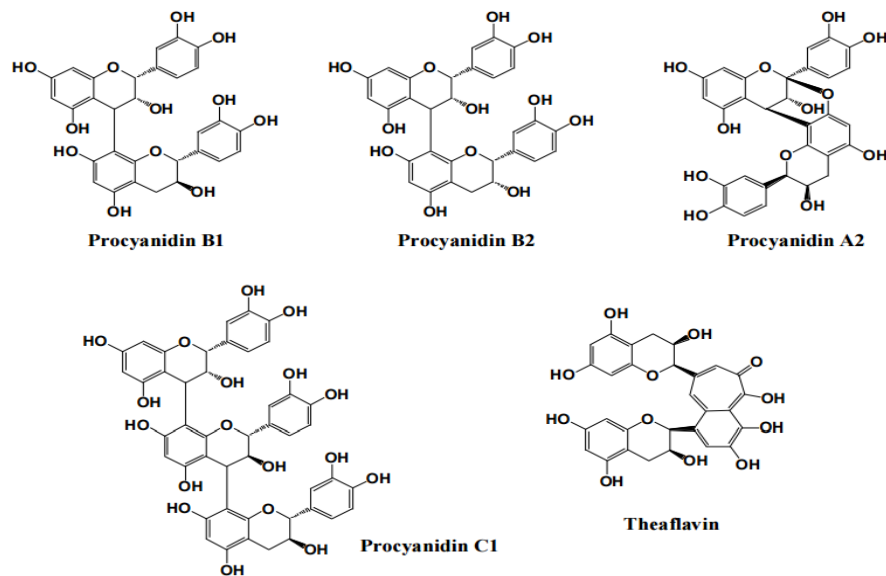


**Figura 11.** Estructura básica de los flavonoides. Fuente: Herrero et al, 2005.



**Figura 12.** Diastereoisómeros.

Las proantocianidinas, se consideran tradicionalmente como taninos condensados. Flavanoles y oligómeros, que contienen de 2–7 unidades monoméricas, son conocidos como antioxidantes fuertes, que han sido asociados con beneficios potenciales para la salud. Dependiendo de las uniones interflavánicas, las estructuras de las proantocianidinas oligoméricas pueden ser de tipo A, en las cuales, los monómeros están unidos a través de C2-O-C7 o C2-O-C5, o de tipo B en las cuales, las uniones C4-C6 o C4-C8 son más comunes (Figura 13). La procianidina C1 es un trímero, también los flavanoles del té pueden formar dímeros, únicos como la teaflavina cuando el té es fermentado (Tsao, 2010).

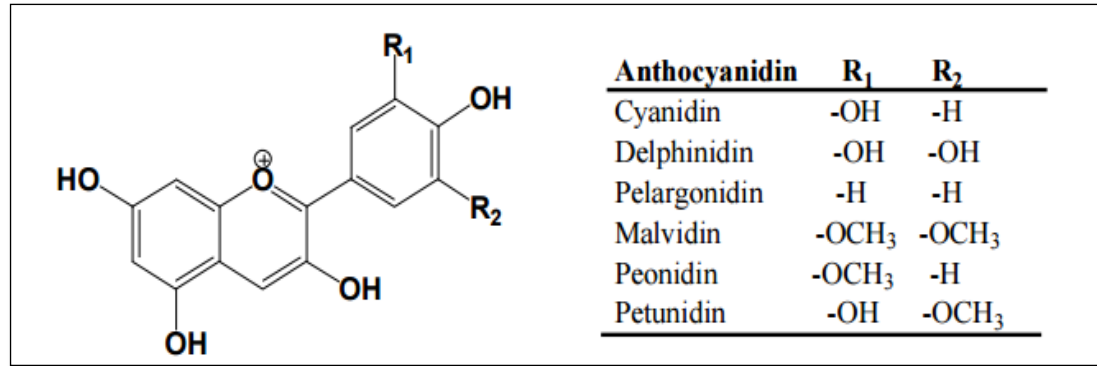


**Figura 13.** Dímeros típicos de procianidinas, trímero y teaflavina. Fuente: Tsao, 2010.

Las antocianidinas son los componentes principales de los pigmentos rojos, azules y púrpuras, de la mayoría de los pétalos de flores, frutas, verduras y algunas variedades de granos. Estas existen en las plantas, principalmente en formas glicosídicas, que comúnmente se denominan antocianinas (Figura 14). Se conocen un total de más de 500 antocianinas, dependiendo de los patrones de hidroxilación y metoxilación en el anillo B y la glicosilación con unidades de azúcar en el C3 del anillo C (Tsao et al., 2010).

#### 2.3.4.1.2 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

A las muestras en estudio, debe darseles un pretratamiento por varios motivos: aumento de la eficacia del procedimiento de extracción, eliminación o reducción de interferentes, mejoramiento de la sensibilidad del método analítico, aumentando la concentración del analito de interés o bien para convertir a este último en un derivado que pueda ser más fácilmente separado, detectado y/o cuantificado. Los procedimientos varían, dependiendo de las características de los compuestos fenólicos y de la complejidad de la muestra, estado físico, tamaño de partícula y presencia de interferentes (Luthria, 2006).



**Figura 14.** Principales antocianidinas. Fuente: Tsao, 2010.

En general cuando las muestras son líquidas, como vino, té o zumos, requieren una manipulación previa mínima como filtrado, centrifugado y/o dilución, para luego ser sometidas al proceso de extracción o para su análisis directo (Robbins, 2003; Stalikas, 2007). Cuando la muestra es sólida, la extracción de los diferentes flavonoides, se realiza a partir del material vegetal fresco, aunque está también puede realizarse con el material vegetal seco, siempre y cuando el proceso de secado no altere la composición de los flavonoides. El material vegetal debe molerse finamente, para de esta forma, facilitar la extracción de los compuestos flavonoicos; estos compuestos se pueden extraer indistintamente, debido a la solubilidad que estos presentan en diferentes solventes orgánicos.

Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos instituidos o azúcares, son considerados compuestos polares, por lo que son moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO, agua. Por otro lado, las agliconas, menos polares como isoflavonas y flavanonas, tienden a ser más solubles en solventes tales como éteres y cloroformo (Dixon y Paiva, 1995; Baran, 1997).

La extracción de estos compuestos se puede realizar con metanol al 85 %, con posterior filtración. El filtrado se concentra y todo el metanol se remueve; la capa acuosa es sucesivamente compartimentada con una serie de solventes orgánicos como: n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. El extracto de hexano, generalmente contiene clorofilas, gomas y cuando están presentes, agliconas de flavonoides, altamente metoxiladas como quercetina 3,7, 3', 4' tetrametil éter y 6-metoxiquercetina

3,7, 3', 4' tetrametil éter, y los extractos de cloroformo y acetato de etilo, son ricos en flavonoides. Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides, pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad, los cuales aparecen en la superficie de las plantas. Para antocianidinas se trata el material vegetal con MeOH conteniendo HCl 1%, (v/v), donde la extracción es inmediata, evidenciándose por el cambio de color de la solución (Baran, 1997).

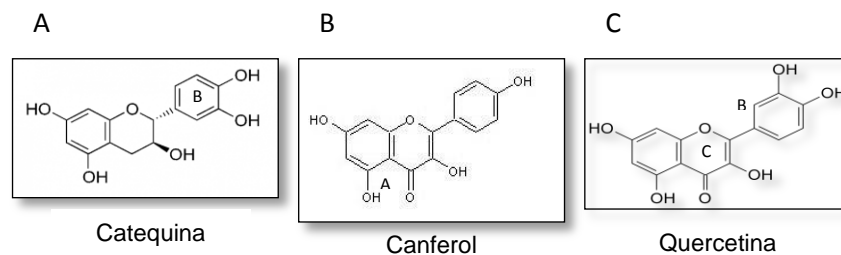
### **2.3.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Los antioxidantes son clasificados como exógenos (naturales o sintéticos) o compuestos endógenos, ambos, responsables de la eliminación de los radicales libres, eliminación de ERO (especies reactivas de oxígeno) o sus precursores, inhibiendo la formación de enlaces entre los ERO y los iones metálicos, necesarios para la catálisis de la generación de ERO (Gilgun et al., 2001). Los polifenoles, son estructuras químicas importantes, como constituyentes de frutas, vegetales, semillas, flores, bebidas e incluso de algunos productos elaborados, que son utilizados como ingredientes naturales, los cuales, contribuyen desde la calidad de los alimentos, hasta la resistencia a enfermedades. Debido a estos efectos benéficos, es de gran interés su investigación (Wollgast y Anklam, 2000).

La capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos se ve determinada por su estructura química, por lo que existen grandes diferencias en la efectividad como antioxidantes, entre distintos grupos de compuestos. Los compuestos polifenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales, los cuales son (Rice-Evans et al., 1997):

Captadores de radicales libres. Los compuestos polifenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación, que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres. El radical fenoxilo generado, es menos reactivo, ya que se estabiliza por resonancia con los electrones  $p$  del anillo aromático. Así, las características estructurales que determinan la capacidad de los compuestos polifenólicos para captar radicales se muestran en la Figura 15, las cuales son:

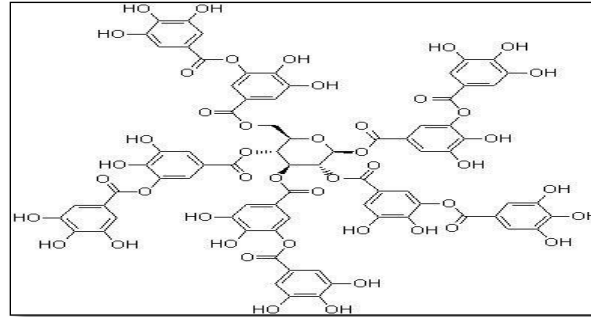
- La presencia de dos grupos hidroxilos en posición orto (3' y 4') en el anillo B, como por ejemplo la catequina (A).
- La presencia de dos grupos hidroxilos en posición meta (5 y 7) en el anillo A, ejemplo canferol, (B).
- La presencia del doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en el anillo C, junto con el grupo 4-ceto, ejemplo la quercetina (C). Estas estructuras son más importantes para la deslocalización de electrones y la estabilización del radical fenoxilo, siempre que además estén presentes los dos orto-hidroxilos en el anillo B.



**Figura 15.** Captadores de radicales libres.

Quelantes de metales. Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres. Generalmente, los siguientes grupos funcionales, se consideran importantes para la capacidad quelante de metales como (Kokhar y Apenten, 2003):

- La presencia de grupo hidroxilo en posición orto (3' y 4' o 7 y 8).
- La presencia del grupo 4-ceto y grupos hidroxilo en posición 5 y/o 3 (ejemplo quercetina).
- La presencia de un gran número de grupos hidroxilos (ejemplo ácido tánico), como se muestra en la Figura 16.



**Figura 16** Estructura química del ácido tánico

### 2.3.5.1 ESTRÉS OXIDATIVO

Según Gilgun-Sherki et al. (2001, citado por Uttara et al., 2009), los radicales libres son moléculas con un electrón impar en su órbita externa, los cuales están involucrados en muchas actividades bioquímicas de las células. Los seres humanos están constantemente expuestos a radicales libres creados por la radiación electromagnética del entorno, que pueden ser hechas por el hombre (contaminantes y humo de cigarro), recursos naturales (radón, radiación cósmica), así como metabolismos celulares (explosión respiratoria, reacciones enzimáticas), además de los radicales libres en el medio ambiente. Los radicales libres a nivel celular son el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), incluso algunas otras moléculas, como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que no son radicales libres, pero los pueden generar a través de varias reacciones químicas.

La sobreproducción de radicales libres puede causar daño oxidativo en biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN), llevando a muchas enfermedades crónicas tales como aterosclerosis, cáncer, diabetes, artritis reumatoide, infarto de miocardio, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica, accidente cerebrovascular, envejecimiento y otras enfermedades degenerativas en seres humanos (Fridovich, 1999; Yun et al., 2002). Los radicales libres de alta reactividad, como el  $\bullet\text{OH}$ , pueden sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos, conduciendo a la reacción en cadena conocida como POL (peroxidación lipídica). Los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al ataque de los radicales libres y como consecuencia, resultan oxidados. La POL ocurre en mayor medida en las



membranas biológicas y en las lipoproteínas. Este evento conduce a un aumento considerable de la permeabilidad de las membranas celulares, que origina alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a su lisis total (Sevanian & Ursini, 2000). La POL puede disminuir la fluidez de las membranas biológicas, inactivar enzimas y receptores asociados a la membrana celular y aumentar la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ . Este fenómeno conduce a la formación de numerosos derivados tóxicos: los hidroperóxidos, los 4-hidroxi-alquenos y otros (Dennis & Shibamoto, 1989).

En cuanto a los aminoácidos, los más sensibles al daño oxidativo son triptófano, tirosina, fenilalanina, metionina y cisteína (Stadtman & Levine, 2000). En especial, el  $\bullet\text{OH}$ , interactúa con muchos aminoácidos, y en ocasiones genera daños puntuales a proteínas que están unidas a metales de transición (Stadtman & Oliver, 1991; Aruoma, 1994). Los aminoácidos aromáticos y el anillo de imidazol de la histidina son hidroxilados como consecuencia de su reacción con el  $\bullet\text{OH}$ . Los aminoácidos de cadena alifática, como son: valina, leucina, isoleucina y prolina, cuando interactúan con el  $\bullet\text{OH}$  resultan peroxidados. Muchas especies reactivas del oxígeno (ERO) son capaces de oxidar grupos sulfidrilos de proteínas, lo cual conduce a su inactivación o reducción de su actividad biológica. Este efecto ha sido observado en numerosas enzimas, como: fosfofructo-quinasa, hexoquinasa, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfatasa, adenilato ciclasa, guanilato ciclasa, entre otras (León et al., 2004).

Otro importante daño oxidativo, que tiene lugar en proteínas, es la oxidación de los grupos amino de los aminoácidos. Los residuos de mayor relevancia en este tipo de modificación son: lisina, arginina, prolina e histidina. Por otro lado, el ONOO- también es responsable del daño a las proteínas por al menos tres mecanismos: 1) puede descomponerse y generar  $\bullet\text{OH}$ . 2) el ONOO- reacciona directamente con los grupos -SH proteicos. 3) puede reaccionar con los iones metálicos para generar una potente especie, el catión nitronio, capaz de nitrar muchos aminoácidos.

Como resultado del ataque de las ERO, se producen entrecruzamientos de cadenas polipeptídicas y fragmentación de las proteínas, perdiendo éstas su función biológica. Las consecuencias bioquímicas de las modificaciones oxidativas de las proteínas, incluyen la pérdida de la función de receptores, enzimas y proteínas de transporte,

así como la generación de nuevos antígenos que provocan respuestas inmunitarias (León et al., 2004). El  $\cdot\text{OH}$  es la ERO principal que actúa sobre el ADN, resultando todos sus componentes susceptibles a la acción de radicales libres. Los daños fundamentales que se obtienen de esta reacción redox son: ruptura de las hebras del ADN, hidroxilación de bases y fragmentación del azúcar 2-desoxi-D-ribosa por el ataque al grupo 3'-OH (Southorn y Powis, 1988; Henle y Linn, 1997; Box et al., 2001). Los metales de transición, hierro y cobre, que en condiciones de estrés oxidativo, pueden ser liberados de las proteínas y a su vez, unirse al ADN, provocando daños como: alteraciones estructurales del ADN, debido a mutaciones, pérdida e inserción de bases; las cuales a su vez conducen a la pérdida de la expresión de genes o a la síntesis de una proteína anormal; como consecuencia se producen alteraciones en el metabolismo y en el crecimiento, así como un funcionamiento inadecuado de las vías de señalización celular; todas estas disfunciones fisiológicas conllevan al desarrollo de enfermedades, como cáncer, al envejecimiento, e incluso pueden conducir a la muerte celular (León et al., 2004).

#### **2.3.5.2 ENSAYOS ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EN COMPONENTES DE ALIMENTOS**

En las últimas décadas, ha habido un creciente interés en los estudios de la actividad antioxidante de los componentes de alimentos y de la dieta, debido a las consecuencias conocidas de radicales libres de oxígeno en el progreso y desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, envejecimiento y cáncer (García-Parrilla, 2008). Para ello, se han desarrollado muchos procedimientos diferentes para probar la capacidad antioxidante total de alimentos (Pellegrini et al., 2003; Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2005). Los métodos pueden dividirse según mecanismos de reacción en TAH (transferencia de átomo de hidrógeno) y los métodos TEI (transferencia de electrones individuales). Los métodos basados en el sistema TEI, detectan el potencial antioxidante para transferir un electrón y reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. Estos ensayos se

muestran a través de un cambio de color del oxidante cuando es reducido (Huang et al., 2005).

Los métodos TAH, miden la capacidad de un antioxidante para inhibir a los radicales libres por la donación de hidrógeno. Estas reacciones son solvente y pH independientes y suelen ser bastante rápidas. La presencia de agentes reductores, incluyendo metales, es una complicación para estos ensayos y puede conducir a una reactividad erróneamente alta (Prior et al., 2005).

Los ensayos basados en este método son: 1. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). 2. Parámetro antioxidante total de atrapamiento de radicales (TRAP). 3. Inhibición de la oxidación inducida de LDL. 4. Ensayo de capacidad total de atrapamiento de oxi-radicales (TOSCA). 5. Ensayo de blanqueamiento Crocin. 6. Ensayo de quimioluminiscencia (Huang et al., 2005).

El método TEI, incluye los siguientes ensayos: 1. Contenido de polifenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu. 2. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). 3. Poder antioxidante de reducción del ion Férrico (FRAP). 4. Potencial antioxidante total usando un complejo de  $\text{Cu}^{2+}$  como antioxidante. 5. Reducción del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). 6. Reducción del radical Ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) 7. Reducción del radical N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD).

Para el objetivo de este trabajo, solo se hace una leve descripción de los ensayos utilizados en esta investigación. Contenido de polifenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR): este método se basa en la transferencia de electrones de los compuestos fenólicos a la FCR (Singleton y Rossi, 1965; Cai et al., 2004; Song et al., 2010). Funciona mediante la medición de la cantidad de la sustancia necesaria para inhibir la oxidación del reactivo (Vinson et al., 2005). El sistema se basa en la mezcla de tungstato y molibdato en un medio muy básico (5–10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  acuoso). Los compuestos fenólicos son enérgicamente oxidados en medio básico, dando lugar a la formación de  $\text{O}_2^-$ , que a su vez, reacciona con el molibdato, formando óxido de molibdeno  $\text{MoO}_4^{4-}$ , teniendo una absorción muy intensa cerca de 750 nm, con una coloración de amarillo a azul. Generalmente, se utiliza ácido gálico como estándar de

referencia y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (Gülçin et al., 2002, 2003, 2004).

Ensayo de reducción del radical (DPPH): El radical DPPH es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estable, que lleva un color morado intenso. En el ensayo, los antioxidantes son capaces de reducir la estabilidad del radical DPPH a difenil-picrylhydrazine de color amarillo. Este método se basa en la reducción del DPPH en solución alcohólica, en presencia de un antioxidante que dona un hidrógeno, para la formación del no radical DPPH-H en la reacción (Gülçin, 2012). En general, los resultados se reportan como la concentración eficiente ( $EC_{50}$ ). El valor de la  $EC_{50}$  es la cantidad de antioxidantes necesario para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH (Brand-Williams et al., 1995). Un valor de  $CE_{50}$  más bajo indica una mayor eficiencia de inhibición del radical. La principal limitación de la determinación de la  $CE_{50}$  es que el porcentaje de radical inhibido es dependiente de la concentración inicial de radical DPPH (Magalhaes et al., 2008).

Oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL): es un ensayo *ex vivo*, en donde la oxidación de las LDL se desarrolla principalmente como una medida del estado antioxidante, pero la aplicación de la oxidación de las LDL también se ha adaptado para evaluar la capacidad antioxidante en un sistema más fisiológicamente relevante (Handelman et al., 1999). Los modelos de oxidación de las LDL con  $CuSO_4$  se basan en la capacidad que tienen los iones de cobre de unirse a la molécula de apo B, e iniciar la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, debido probablemente a una descomposición catalizada por el cobre de los hidróxidos lipídicos presentes en las LDL, que los conducirá a la formación de un radical peroxil, que puede iniciar una nueva cadena de reacciones de oxidación (Loy et al., 2002). Se mide la absorbancia a 532 nm.

## 2.4 CHILATE COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES

“**Chilate**”, bebida no alcohólica, típica del sur de México, principalmente del estado de Guerrero, que se prepara con cacao, arroz, canela y azúcar. Los ingredientes forman una pasta con delicioso sabor a chocolate, la cual es de consistencia

cremosa y de color café, ésta se licua con agua y hielo para servir muy fría. Esta bebida, es consumida principalmente en regiones del estado de Guerrero, como Acapulco y municipios de la región de Costa Chica y de Tierra Colorada. Se consume a cualquier hora del día, especialmente cuando hace mucho calor, en algunos otros municipios de estas regiones, solo se prepara cuando se celebran fiestas como: fiestas patronales, bodas, bautizos, en Navidad, año nuevo, etc. No se ha encontrado información de la bebida como tal en la literatura, por lo que la descripción y la forma de preparación son empíricas.



Figura 17. Chilate.

#### **2.4.1 PROPIEDADES DE LOS INGREDIENTES DEL CHILATE**

El chilate está conformado por ingredientes 100% naturales, como cacao, canela, entre otros, los cuales, por medio de pruebas *in vivo* e *in vitro*, han demostrado poseer buena capacidad antioxidante, y beneficios a la salud, debido, principalmente a su alto contenido de compuestos fenólicos.

##### **2.4.1.1 POLIFENOLES EN CACAO**

El cacao proviene de las semillas del fruto del árbol (*Theobroma cacao L.*). Se han realizado estudios sobre los beneficios a la salud de productos del cacao en la última década, con un enfoque principal de las enfermedades degenerativas. Estos beneficios podrían ser debido a su significativa cantidad de flavonoides monómeros (catequina y epicatequina) hasta tetradecameros (Kelm et al., 2006).

De acuerdo con Wollgast y Anklam (2000), los diferentes polifenoles que han sido identificados en granos de cacao y en sus productos, son los siguientes: Catequinas: (-)-epicatequina, (+)-catequina, (+)-gallocatequina, (-)-epigallocatequina, Procyanidinas como: B1=epicatequina-(4 $\beta$ -8)-catequina, B2=epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina, B3=catequina-(4 $\alpha$ -8)-catequina, B4=catequina-(4 $\alpha$ -8)-epicatequina, B5=epicatequina-(4 $\beta$ -6)-epicatequina, C1=epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina, D=epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina, polímeros y oligopolímeros, en su mayoría homólogos de la epicatequina con 2 a 18 a unidades monoméricas. Antocianinas como: cianidina-3- $\alpha$ -L-arabinosid, cianidina-3- $\beta$ -D-galactosid, Flavonoles glucosidos como: quercetina-3-O- $\alpha$ -D-arabinosid y la quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucopuranosid.

Recientemente, se ha demostrado que el chocolate es uno de los alimentos más ricos en polifenoles, incluso más que el té verde y el vino tinto (Arts et al., 1999, 2000; Lee et al., 2003). Debido a que el consumo es típico en bebidas y dulces, la composición de la matriz de alimentos de chocolate tiene un gran potencial para modular la absorción y la farmacocinética de flavan-3-ols. Los principales factores que afectan a la farmacocinética de flavan-3-ols del cacao, son la composición de macronutrientes (carbohidratos (generalmente sacarosa), lípidos y proteínas (normalmente leche o sólidos de leche)) y el estado físico (líquido y sólido) del producto (Neilson y Ferruzzi, 2011). Aunque no está claro el mecanismo por el cual la sacarosa aumenta la velocidad de absorción de catequinas, estudios similares con el té verde, han indicado que la formulación con sacarosa puede mejorar la biodisponibilidad de las catequinas por mejorar la solubilidad y absorción intestinal (Peters et al., 2010).

Estudios han demostrado que los polifenoles del cacao poseen ciertos beneficios farmacológicos como: efectos antiobesidad (Ferrazzano et al., 2009), reduce el síndrome de fatiga crónica (Sathyapalan et al., 2010), enfermedades neurodegenerativas (Katz et al., 2011; Bisson et al., 2008). Ding et al. (2006), llevaron a cabo una revisión sistemática de alrededor de 136 estudios clínicos, observacionales y experimentales de la relación entre el chocolate, el cacao y el riesgo de enfermedades cardiovasculares, los cuales sugieren que el cacao y el

chocolate pueden ejercer efectos beneficios en cuanto a riesgo cardiovascular a través de varios mecanismos, incluyendo disminución de la presión arterial, función antiinflamatoria, antiplaquetaria, aumentando el nivel de HDL, disminuyendo la oxidación del LDL. Además, estudios prospectivos de flavonoides sugieren que el contenido fenólico de chocolate puede reducir el riesgo de mortalidad cardiovascular.

#### **2.4.1.2 FACTORES QUE AFECTAN A LOS POLIFENOLES EN CACAO Y PRODUCTOS DE CACAO**

Othman et al. (2007), reportaron que granos de cacao de diferentes países pueden tener contenidos diferentes de polifenoles, por lo que esta característica puede considerarse como unos de los principales factores que afectan la calidad y el contenido de los polifenoles.

Los granos de cacao pasan por varias etapas de procesamiento antes de convertirse en cacao crudo (fermentado y secado de granos de cacao) y productos a base de cacao. Los productos de cacao son productos que fueron preparados de cacao o componentes relacionados con el cacao: licor de cacao, manteca de cacao y estos productos van desde chocolates, pasteles, mousses y bebidas (Jalil e Ismail, 2008).

Se ha demostrado que los chocolates producidos a partir de granos sin fermentar, no tienen sabor a chocolate o están excesivamente astringentes y amargos. La fermentación reduce el nivel de amargor y la astringencia de la semilla de cacao, lo que se puede atribuir a la pérdida de polifenoles durante la fermentación. Stark et al. (2005), demostraron que las catequinas (epicatequina, catequina, procianidina B2, B5 y procianidina C1), eran los principales compuestos responsables de la amargura y la astringencia del cacao tostado, sin embargo no sólo eran atribuibles a los polifenoles, sino también a los aminoácidos. Pettipher (1986), demostró que el color de las procianidinas se transforma en rojo marrón insoluble, dando el característico color de chocolate durante la fermentación y el tostado.

Los ingredientes básicos necesarios para la fabricación de chocolate son licor de cacao, azúcar, edulcorantes, manteca de cacao, aceite, leche en polvo, residuos de leche y emulsionantes. El contenido de polifenoles puede variar enormemente dependiendo de la fuente de cacao, condiciones de procesamiento primario y

secundario y proceso de fabricación de chocolates. Debido a estos factores, la proporción y tipo de polifenoles encontrados en los granos de cacao es poco probable que sea igual a los que se encuentran en los productos terminados (Cooper et al., 2007). Según Cooper et al. (2008), la presencia de cacao sólido sin grasa, es un excelente marcador para determinar el contenido fenólico total. Teóricamente, una mayor cantidad de cacao sólido sin grasa, indica un mayor contenido fenólico en los chocolates. Además de que hubo una relación positiva y significativa entre el cacao sólido sin grasa y las propiedades antioxidantes.

La presencia de la (-)-catequina en chocolates podría deberse a la epimerización de la (-)-epicatequina durante la fabricación de chocolates. Se ha reportado a la epicatequina como el principal polifenol presente en granos de cacao (Nelson et al., 2003; Kofink et al., 2007), un estudio reciente mostró que los granos tostados de cacao y sus productos contienen flavan-3-ol (-)-catequina, (+)-catequina y (-)-epicatequina. El compuesto se formó durante el proceso de fabricación por epimerización de (-)-epicatequina y su epímero (-)-catequina.

Otro factor importante a tomar en cuenta es el almacenamiento poscosecha, ya que existe poca información acerca de los cambios ocurridos en la composición y actividad de los compuestos fenólicos. La temperatura de almacenamiento, además de la exposición a la luz y al oxígeno, es uno de los factores clave que influyen en la estabilidad de los antioxidantes fenólicos en frutos durante el almacenamiento (Kalt et al., 1999).

#### **2.4.1.3 POLIFENOLES EN ARROZ**

Entre las fuentes de compuestos fenólicos, debe destacarse al arroz (*Oryza sativa*), porque es uno de los cereales más producidos y consumidos en el mundo y juega un papel importante en la relación dieta-salud (Iqbal et al., 2005).

Goufo y Trindade (2014), realizaron una revisión de 316 documentos, los cuales fueron seleccionados por contener principalmente la composición y contenido de compuestos fenólicos en las diferentes partes del arroz. El arroz cosechado del campo se conoce como arroz o arroz áspero, la molienda es el proceso en el cual, el arroz se transforma en una forma que es conveniente para el consumo humano. El



proceso comienza con la eliminación de la cáscara no comestible (o casco), que cubre el grano, produciendo el grano entero (o arroz), que no es otra cosa que el endospermo del arroz, también conocido como arroz blanqueado, arroz pulido o arroz blanco. En general, el endospermo del arroz se prefiere sobre el grano entero, debido a sus características sensoriales deseables y estabilidad del almacenaje.

El contenido fenólico varía dependiendo de las diferentes fracciones del arroz y de sus variedades, pero de manera general, se encontró que la mayor concentración de polifenoles se encuentra en el salvado para variedades de arroz incoloros y pigmentados, respectivamente, siendo 1.8 veces mayor que la cáscara, de 31 a 4.2 veces mayor que el grano entero y de 5.4 a 15.6 veces mayor que el endospermo.

Entre la composición fenólica se encuentran: Ácidos fenólicos, en donde el más abundante en endospermo, salvado y grano entero, es el ácido ferúlico (56, 77% de ácidos fenólicos totales), seguido por el ácido p-cumárico (8-24%), ácido sinápico (2-12%), ácido gálico (1-6%), ácido protocatecuico (1-4%), ácido p-hidroxibenzoico (1-2%), ácido vanílico (1%) y ácido siríngico (1%). Flavonoides presentes en el siguiente orden: luteolina (14%) > apigenina (6%) > quercetina (3%) > isorhamnetina (1%) > kaempferol (<1%) > miricetina (<1%). Se han identificado alrededor de 18 antocianinas de las cuales solo 4 se han cuantificado: cianidina-3-O-glucosido, peonidina-3-O-glucosido, cianidina-3-O-rutinosido y cianidina-3-O-galactosido. Los tocoferoles y tocotrienoles se encuentran en diferentes concentraciones, dependiendo de la fracción de grano de arroz, siendo el  $\gamma$ -tocotrienol el que contribuye más al contenido total (27-63%), seguido de  $\alpha$ -tocoferol (10-30%),  $\alpha$ -tocotrienol (9-19%),  $\gamma$ -tocoferol (9-14%),  $\delta$ -tocotrienol (2-6%),  $\beta$ -tocotrienol (1-4%),  $\beta$ -tocoferol (1-2%) y  $\delta$ -tocoferol (1-2%). El ácido fítico, es la forma más abundante de fósforo en grano entero y salvado, que representa alrededor del 65-73% del contenido total, mientras que en el endospermo se encuentra sólo un 37%.

#### **2.4.1.4 POLIFENOLES EN CANELA**

La canela ha demostrado tener una fuerte capacidad antioxidante, la cual se atribuye a su contenido de polifenoles, tales como ácido protocatecuico, cinnamtannin B-1,

urolignosido, rutina y quercetina-3-O-R-L-ramnopiranosida (Jayaprakasha et al., 2006).

El ácido protocatecuico es un tipo de ácido fenólico que se ha divulgado por su potencial acción como antioxidante, actividad antibacteriana, actividad anticancerosa, antiulcerosa, actividad antidiabética, actividad antiviral, actividad antiinflamatoria, actividad analgésica, actividad cardiaca entre otras (Kakkar y Bais, 2014).

### 3 JUSTIFICACIÓN

México es un un país con una cultura ancestral y abundante en sabores e ingredientes en lo que refiere a materia gastronómica y de forma particular en la prepracion de sus bebidas, desafortunadamente, el uso de nuevas tecnologías, la industrialización, la globalización y el ritmo de vida acelerado, esta orillado a la población mexicana a adoptar culturas externas, que implican el consumo de alimentos y bebidas procesadas, hecho que genera un aumento en la prevalencia de enfermedades crónico no transmisibles (ECNT). Hay bebidas originarias de México que han sido ampliamente estudiadas y que son reconocidas mundialmente, a su vez existen otras que son de consumo común en ciertas regiones y no son conocidas en el resto del país, tal es el caso del chilate, bebida típica del estado de Guerrero, que es preparada a base de una pasta hecha con ingredientes naturales como cacao, arroz, canela y azúcar, los cuales han sido de gran interés por su alto contenido de compuestos fenólicos, que son los responsables de la capacidad antioxidante. No se han encontrado documentos que avalen el estudio de esta bebida como tal, por lo que es importante hacer un análisis de su aporte nutritivo y de los beneficios que pueda aportar a la salud con enfoque en su actividad antioxidante. Se debe tomar en cuenta que esta actividad se ve afectada por los procesos de producción, el tiempo y las condiciones de almacenamiento, tales como la temperatura, lo que modifica la calidad de los compuestos fenólicos y por lo tanto su capacidad antioxidante. Por lo anterior, es importante conocer la capacidad antioxidante del chilate y su comportamiento durante el tiempo de almacenamiento.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener y caracterizar una formulación del chilate con reducción en el aporte calórico y analizar su capacidad antioxidante.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.-Estandarizar y seleccionar mediante una prueba de análisis sensorial, la fórmula que presente mayor aceptabilidad y menor aporte calórico
- 2.-Caracterizar las materias primas para elaborar la pasta del chilate mediante un análisis químico proximal.
- 3.-Evaluar la capacidad antioxidante y su comportamiento bajo diferentes condiciones de almacenamiento.



**MATERIALES  
Y MÉTODOS**

## **5 MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 MATERIALES**

Los ingredientes para elaborar la pasta de chilate (semillas de cacao, arroz, azúcar y canela) y la muestra de chilate en polvo (comercial), se obtuvieron del mercado municipal de Ayutla de los Libres, Guerrero, La muestra en polvo se encontró en una presentación de 250 g dentro de una bolsa sellada de celofán transparente. En el caso de la muestra de chilate líquida (comercial), se consiguió en una presentación de 500 mL en botella de plástico que se adquirió en un centro comercial de Acapulco, Guerrero.

### **5.2 MÉTODOS**

#### **5.2.1 PREPARACIÓN ARTESANAL DEL CHILATE**

En la Tabla 1 se muestran los ingredientes y la cantidad necesaria para la preparación del chilate, siguiendo la formulación original. A continuación se describe la elaboración de la pasta de chilate:

- 1.- Descascarillado del cacao: se realizó una selección de las semillas de cacao por tamaño, esto, con el fin de que el calentamiento fuera homogéneo en todas las semillas. Estas últimas fueron colocadas en una charola de acero inoxidable y se metieron en una estufa de laboratorio durante aproximadamente 60 min a una temperatura de 125 °C. Después, las semillas fueron descascarilladas manualmente.
- 2.- Remojo del arroz: El arroz junto con las rajadas de canela (en trozos), se sometieron a remojo en un litro de agua purificada. Posteriormente el arroz junto con la canela se escurrieron en una coladera de plástico, previo al molido.
- 3.- Molido de ingredientes: el cacao descascarillado, el arroz, la canela y el azúcar se molieron en un molino de grano hasta la obtención de la pasta completamente homogénea.

Para la preparación de la bebida, se licuaron alrededor de 200 g de pasta en 1 litro de agua con hielo y se sirve frío.

**Tabla 1** Ingredientes para la elaboración del chilate formulación original

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Semillas de cacao previamente descascarilladas	1 kg
Arroz	1 Kg
Canela en rajas	50 g
Agua	2 L
Hielos	Al gusto

### 5.2.2 ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizó una prueba de aceptabilidad por ordenamiento, utilizando rangos para obtener una indicación de la muestra con el sabor más aceptable. Para la cual se prepararon muestras de chilate utilizando cuatro formulaciones diferentes y a las cuales se les asignó un código de tres números al azar (Tabla 2).

**Tabla 2** Formulaciones de chilate

<b>Código</b>	<b>Cantidad de azúcar</b>
570 (Formula Original)	1000 g de azúcar por cada 2 kg de pasta
480	900 g de azúcar por cada 2 kg de pasta
310	800 g de azúcar por cada 2 kg de pasta
640	700 g de azúcar por cada 2 kg de pasta

Cincuenta panelistas no entrenados, fueron seleccionados de entre alumnos y personal de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). La prueba se llevó a cabo en la sala de Análisis Sensorial en el laboratorio de Química de Alimentos de la UAEH. Todos los tratamientos se presentaron simultáneamente a cada uno de los panelistas, quienes evaluaron la muestra una sola vez. Se obtuvieron 12 posibilidades para servir las muestras (Anexo I), las cuales fueron

presentadas al azar. En el Anexo II, se muestra la boleta utilizada en la prueba. A los panelistas se les pidió ordenar las muestras de acuerdo a su aceptabilidad y evitar clasificar dos muestras en la misma posición, debiendo dar un valor diferente a cada muestra, incluso si les parecía similar. Se asignó un valor de 1 a la muestra más aceptable, un valor de 2 a la muestra que le seguía en grado de aceptabilidad, 3 a la que seguía y un valor de 4 a la de sabor menos aceptable. Los resultados fueron analizados por la prueba de Friedman en donde se utiliza una tabla ampliada (Anexo III) para 3-100 panelistas y 3-12 muestras (Newel y MacFarlane, 1987). Las diferencias entre todos los posibles pares se compararon con el valor crítico de la tabla, al número de panelistas y muestras empleadas en la prueba en base a un nivel de significancia de 5%. Si la diferencia entre los pares totales de valores de posición es superior al valor crítico de la tabla, se concluye que el par de muestras es significativamente diferente al nivel de significancia seleccionado (Watts et al., 1992).

### **5.2.3 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (AQP)**

El cacao, el arroz y la canela fueron pulverizados para su análisis. En el caso del cacao, fue previamente descascarillado siguiendo el método de preparación de la bebida. La muestra de chilate en polvo se tomó tal cual para el análisis. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado siguiendo las metodologías de la Tabla 3. El cálculo de energía se llevó a cabo siguiendo la metodología de Gul y Safdar (2009), en donde las calorías de la formulación original y la formulación con reducción de azúcar de chilate, se calcularon multiplicando el porcentaje de proteína cruda y carbohidratos por 4 y el porcentaje de grasa (Lípidos) por 9. Los valores fueron convertidos a calorías por porción de 250 mL de la bebida preparada.

### **5.2.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

#### **5.2.4.1 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Se preparó chilate en pasta según la formulación elegida en las pruebas sensoriales, esta se dividió en 2 partes: la primera se mantuvo en refrigeración (R) (6 °C) y la



segunda se mantuvo a temperatura ambiente (TA) (18 °C), ambas dentro de una bolsa negra cerrada. Se tomaron muestras de 10 g cada tercer día hasta que ambas pastas presentaron hongo, para la muestra R se manejaron siete días (0, 3, 5, 7, 9, 11, 13), de la muestra TA se obtuvieron tres días (0, 3 y 5), tomando el día cero, el día en que se preparó la pasta. De igual forma, para el chilate comercial en polvo (CP), se tomaron muestras de 10 g cada tercer día obteniendo un total de 6 muestras (día 0, 3, 5, 7, 9 y 11), se tomó como día 0 el día en que se abrió la bolsa, la cual se mantuvo en obscuridad y se conservó en refrigeración (6°C). Del chilate comercial líquido (CL), solo se tomó una muestra directa de la botella, la cual se encontraba en refrigeración. Y por último se tomó como control el extracto de semillas de cacao (CACAO), las cuales fueron descascarilladas siguiendo el proceso de elaboración de la pasta de chilate.

**Tabla 3.** Metodologías del Análisis Químico Proximal

<b>Componente</b>	<b>Método</b>
Humedad	Termobalanza (OHAUS MB45 Switzerland).
Cenizas	923.03, AOAC, 1997
Grasa	920.39, AOAC, 1997
Proteínas	MicroKjeldahl AOAC, 1997
Fibra cruda	925.08, AOAC, 1990
Carbohidratos	Se obtuvo por diferencia.

#### **5.2.4.1.1 DESENGRASADO DE LAS MUESTRAS**

Se tomaron 10 g de las muestras: R, TA, CP y CACAO, los cuales se metieron en una estufa de laboratorio durante 5 h a 60 °C, para eliminar la humedad. Posteriormente se siguió la metodología utilizada por Natsume et al. (2000), con ligeras modificaciones, en donde la muestra seca fue tratada con hexano a una relación 1:20 (p/v) a temperatura ambiente y con agitación, durante 30 min, para remover la grasa, pasado este tiempo, la muestra se filtró a través de papel filtro

Whatman de 150 mm, el cual se dejó secar con la muestra en un desecador 5 h, aproximadamente. Para el caso de la muestra CL se tomaron 40 mL y se siguió la misma metodología a partir del tratamiento con hexano donde se usó una relación 1:1 (v/v).

#### **5.2.4.1.2 EXTRACCIÓN DE FENOLES**

A 5 g de muestra, previamente desengrasada, se le agregaron 50 mL de una solución de acetona al 70% y se dejó en agitación durante 24 h, en obscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó una centrifuga (Clinaseal) a 3500 rpm durante 5 min, para separar la fase orgánica del sedimento. Se evaporó la acetona a 45 °C en un rotavapor (Buchi R-210/215), el líquido restante se mezcló con acetato de etilo en una proporción 1:1 v/v, para una purificación parcial, el solvente fue nuevamente evaporado a 50 °C en el mismo rotavapor, para luego resuspender el extracto con 5 mL de metanol, los cuales se guardaron en tubos de vidrio con taparosca en oscuridad y refrigeración hasta su utilización.

#### **5.2.4.2 CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES**

Para la cuantificación de polifenoles totales se empleó el método de Follin-Ciocalteu, según Heimler et al. (2005). Se realizó una curva de calibración utilizando como estándar una solución de ácido gálico a 1 mg/mL en agua destilada, de las cuales se realizaron 5 concentraciones (de 20 a 100 ppm). Para las muestras se hizo una dilución de 50 ppm con agua destilada.

En un tubo de ensaye se colocaron 125 µL de muestra, 500 µL de agua destilada y 125 µL de reactivo de folin-Ciocalteu's. Se agitó la mezcla y se dejó reposar por 6 min en oscuridad. Pasado este tiempo se adicionaron 1.25 mL de solución al 7% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1mL de agua destilada, se agitó nuevamente en un vortex y se dejó reposar en oscuridad por 90 min a temperatura ambiente.

Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Cary 50 UV-VIS) y los resultados fueron expresados como mg de equivalente de ácido gálico por g de muestra (mgEAG/g).

### 5.2.4.3 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

Para la evaluación de flavonoides totales se empleó el método según Heimler et al. (2005). Se realizó una curva estándar de catequina a 1 mg/ml, de la cual se realizaron 5 concentraciones (20-100 ppm) en agua destilada.

A 0.25 mL de muestra diluida se le adicionaron 75  $\mu$ L de una solución de  $\text{NaNO}_2$  al 5%, 0.150 mL de una solución recién preparada de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y 0.5 mL de  $\text{NaOH}$  1 M. Se ajustó el volumen a 2.5 mL con agua desionizada y se dejó reposar durante 5 min. Se midió la absorbancia a 510 nm con blanco sin muestra. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de catequina por g de muestra (mgECA/g).

### 5.2.4.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE VÍA EL BLANQUEAMIENTO DEL RADICAL DPPH\*

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Manzocco et al. (1998). Se prepararon diluciones de la muestra a diferentes concentraciones (10, 50, 100 y 500 ppm) con metanol, en el caso del blanco, se utilizó metanol en lugar de la muestra. A cada tubo de ensaye que contenía las diferentes diluciones de la muestra y del blanco, se les adicionó un volumen de 2900  $\mu$ L de la solución de DPPH+ a una concentración de  $6 \times 10^{-5}$  M (diluido en metanol), se agitaron los tubos con un vortex y se dejaron reposar durante 30 min en ausencia de luz, para después leer la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro (Cary 50 UV-Vis). Se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left[ \frac{(ADPPH - A_{\text{Extr}})}{ADPPH} \right] \times 100$$

Dónde:

$ADPPH$ = absorbancia del blanco.

$A_{\text{Extr}}$ = absorbancia de la muestra.

El porcentaje de inhibición es usado para encontrar la concentración a la cual el 50% del radical es atrapado ( $CE_{50}$ ).

#### **5.2.4.5 INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LDL**

El ensayo de la inhibición de las LDL se siguió empleando la metodología de Loy et al. (2002). El cual se describe a continuación.

##### **5.2.4.5.1 OBTENCIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO**

El plasma sanguíneo fue donado por el Centro de Transfusión Sanguínea del Estado de Veracruz, de un paciente clasificado como sano y del tipo de sangre “O” RH “positivo”.

##### **5.2.4.5.2 PRECIPITACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD**

La precipitación de las lipoproteínas de baja densidad se realizó haciendo uso de un reactivo precipitante marca Biosystems, de la siguiente manera: por cada 4 mL de plasma se agregaron 7.5 mL del reactivo precipitante, se mezclaron ligeramente por 5 min, para después centrifugar a 3500 rpm por 10 min, una vez centrifugado se separó el sobrenadante y se pesó la fracción precipitada. Finalmente se agregó una solución buffer de fosfatos a un pH de 7.4 en una relación 1:10 por cada gramo de precipitado. Las LDL se congelaron hasta su uso.

##### **5.2.4.5.3 ENSAYO DE OXIDACIÓN DE LAS LDL**

Se preparó una solución stock de muestras (1 mg/mL en Buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4) y se diluyeron a 1, 10 y 100 ppm, con amortiguador. Se utilizó catequina como estándar de referencia y ésta se preparó de la misma forma que las muestras.

La reacción consistió en mezclar 500  $\mu$ L de Buffer, 100  $\mu$ L de  $\text{CuSO}_4$  0.5 mM, 100  $\mu$ L de la muestra diluida y 300  $\mu$ L de LDL. Para el blanco se adicionaron 100  $\mu$ L de Buffer en lugar de la muestra, los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron a 37 °C por 3 h. Transcurrido ese tiempo, se agregó 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.37%, se agitaron los tubos en un vórtex y se calentaron a 95 °C en un baño María por 20 min, enseguida se detuvo

la reacción en un baño de hielo por 5 min. Posteriormente se adicionaron 2 mL de n-butanol y se agitó por 30 s cada muestra. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min. Se separó la fase orgánica, de la cual, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Cary 60 UV-Vis), a una longitud de onda de 532 nm. El espectrofotómetro se ajustó a cero con n-butanol y los resultados se expresaron como porcentaje de la inhibición de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\% INH = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

El porcentaje de inhibición fue usado para encontrar la concentración a la cual se inhibe el 50% de la peroxidación lipídica, también conocida como concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>).

### **5.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), mediante pruebas de comparación de medias por el método de Fisher ( $p < 0.05$ ), utilizando el software Statistica versión 10.



## **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

## **6 RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **6.1 ANÁLISIS SENSORIAL**

Los valores de ordenamiento dados a cada muestra por los 53 panelistas se presentan en la Tabla 4. Para simplificar la diferencia total de pares, se asignó una letra a cada código, como se muestra a continuación: 570: A, 480: B, 310: C Y 640: D. La diferencia entre el total de pares se muestra en la Tabla 5.

Según la Tabla ampliada del Anexo III, el valor crítico tabulado ( $p < 0.05$ ) fue de 34 para 50 panelistas y cuatro muestras. Por lo tanto, se observó que existió diferencia estadísticamente significativa, con respecto al sabor entre la muestra A, que corresponde a la formulación original (con 1000 g de azúcar) en referencia a las muestras C y D (800 y 700 g de azúcar, respectivamente), sin embargo no existió diferencia significativa de la primer muestra con respecto a la muestra B (900 g de azúcar). También se observó que no hay diferencia significativa entre la muestra B y C. Los resultados indican que la cantidad de azúcar influye considerablemente en el sabor de la bebida, siendo la formulación original la que gustó más, ya que es la más dulce y la formulación con menor cantidad de azúcar fue la que menos gustó. Ya que no hubo diferencia en la aceptabilidad entre la muestra original y la muestra B, se puede disminuir 100 g de azúcar de la formulación original sin modificar el sabor de la bebida y así poder reducir su aporte calórico.

### **6.2 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (AQP)**

Se realizó el análisis químico proximal (AQP) a las materias primas: arroz, cacao y canela por separado, esto con el fin de conocer su composición y el aporte que otorgan a la bebida como tal. En la Tabla 6, se muestra un resumen del AQP de los ingredientes.

Se observó que el mayor contenido de humedad lo presentó el arroz con un 11.06%, valor que coincide con el reportado en la Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica INCAP (2007).

**Tabla 4** Datos de ordenamiento tabulados en la prueba de aceptabilidad

Panelistas	Muestras			
	570	480	310	640
1	2	1	4	3
2	1	2	3	4
3	1	2	4	3
4	1	3	2	4
5	1	3	4	2
6	1	4	2	3
7	2	1	3	4
8	2	1	3	4
9	1	3	4	2
10	1	4	3	2
11	1	2	3	4
12	3	2	4	1
13	1	4	2	3
14	1	2	3	4
15	1	3	2	4
16	1	3	2	4
17	2	1	3	4
18	2	1	4	3
19	1	2	3	4
20	1	2	3	4
21	1	2	3	4
22	1	2	3	4
23	1	2	3	4
24	3	2	1	4
25	3	2	1	4
26	1	2	3	4
27	1	4	2	3
28	1	2	3	4
29	2	1	3	4
30	3	1	2	4
31	2	3	1	4
32	3	2	1	4
33	2	1	4	3
34	2	1	3	4
35	1	2	3	4
36	2	1	3	4
37	1	4	2	3
38	2	1	3	4



39	1	2	4	3
40	1	2	3	4
41	4	2	3	1
42	2	3	1	4
43	4	1	2	3
44	1	4	2	3
45	1	2	3	4
46	1	2	3	4
47	1	2	3	4
48	1	2	3	4
49	3	4	2	1
50	4	2	3	1
51	1	2	3	4
52	1	4	3	2
53	4	2	1	3
<b>Total de rangos</b>	<b>89</b>	<b>117</b>	<b>144</b>	<b>180</b>

Rango superior = 1= sabor más aceptable; 4 = sabor menos aceptable

**Tabla 5** Diferencia entre total de pares

<b>Muestras</b>	<b>Total</b>
D-C	36
D-B	63
D-A	91
C-B	27
C-A	55
B-A	28

**Tabla 6** Análisis Químico Proximal de los ingredientes del chilate

Ingredientes	Humedad %	Cenizas %	Grasa %	Proteína %	Fibra cruda %	Carbohidr atos %
Cacao	1.19 ± 0.04a	2.80 ± 0.19 b	32.38 ± 3.71b	15.80 ± 0.36c	28.12 ± 1.93a	17.64 ± 0.41a
Arroz	11.06 ± 0.09c	0.34 ± 0.00a	1.04 ± 0.21a	9.09 ± 0.06b	5.94 ± 0.34b	72.05 ± 0.27c
Canela	9.43 ± 0.12 b	4.03 ± 0.07c	2.89 ± 1.13a	6.09 ± 0.02a	35.73 ± 8.21a	35.75 ± 1.15b

Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de tres determinaciones. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Todos los resultados, excepto la humedad, están expresados en base seca

De los tres ingredientes, la canela fue la que presentó el mayor porcentaje de cenizas, este valor fue mayor al obtenido por Gul y Safdar (2009), estos mismos autores evaluaron los constituyentes inorgánicos de la canela, reportando un mayor contenido de potasio, magnesio, calcio y fósforo y en menor cantidad, zinc y hierro. En cuanto al contenido de grasa, el cacao fue el que presentó mayor porcentaje, sin embargo, este valor fue menor a los reportados por Álvarez et al. (2007) y Lares et al. (2012), estos últimos autores concluyeron que factores genéticos y ambientales tienen influencia decisiva en el contenido de grasa; también reportaron que existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la disminución del contenido de grasa por efecto del tostado, a estos factores se pueden atribuir los valores obtenidos en este estudio. Las propiedades fisicoquímicas de la manteca de cacao, son las responsables de dar textura suave, plasticidad, fácil liberación de sabor y olor, viscosidad y punto de fusión (Cook, 1972; Martin, 1987, mencionado por Álvarez et al., 2007), cuyas características son de importancia en la industria chocolatera. Con respecto al contenido de ácidos grasos saturados e insaturados, se ha reportado previamente que estos son principalmente: ácido esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y palmítico (C16:0), encontrándose en menor concentración el ácido linoleico (C18:2) (Álvarez et al., 2007; Lares et al. 2012). El cacao es nuevamente el ingrediente que aporta mayor cantidad de proteínas, con un 15.8%, este valor es ligeramente mayor a los reportados por Álvarez et al. (2007) y Lares et al. (2012).

Adeyeye et al. (2010), reportaron que las semillas de cacao contienen alrededor de 18 aminoácidos, entre los cuales, se encuentran los 10 aminoácidos esenciales. Encontrándose en mayor concentración el ácido glutámico (Glu), en un rango de 128 a 153 mg/g de proteína cruda (pc), seguido del ácido aspártico (Asp), con un contenido que oscila entre 82 a 100 mg/g cp, habiendo ligeras diferencias en la cantidad de aminoácidos si la semilla fue fermentada o no. Para la mayoría de los aminoácidos esenciales: Lisina (Lys), Histidina (His), Arginina (Arg), Treonina (Thr), Valina (Val), Isoleucina (Ile) y Fenilalanina (Phe), el proceso de fermentación mejora el perfil de aminoácidos del cacao. Por lo que se podría presumir que las proteínas del cacao son de alto valor nutrimental. En cuanto a la mayor concentración de fibra cruda, esta lo presenta la canela con un 35.7%, cuyo valor coincide con el reportado por Gul y Safdar (2009) y el arroz fue el que presento mayor concentración de carbohidratos (72%), este valor coincide con el reportado por la Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica INCAP (2007).

Se observa que es una bebida completa, hablando nutricionalmente, ya que todos los ingredientes aportan en menor o mayor cantidad lípidos, proteínas, fibra cruda y carbohidratos. En la Tabla 7, se presenta de manera general la composición de la pasta de chilate de la formulación original y en la Tabla 8 se muestra la composición de la pasta de chilate elaborada a partir de la formulación reducida en azúcar.

**Tabla 7.** Composición de la pasta de chilate formulación original.

<b>Componentes</b>	<b>%</b>
Humedad	19.1
Cenizas	0.9
Grasa	8.9
Proteína	6.7
Fibra cruda	9.5
Carbohidratos	54.9

**Tabla 8.** Composición de la pasta de chilate formulación reducida en azúcar.

<b>Componentes</b>	<b>%</b>
Humedad	19.1
Cenizas	0.9
Grasa	9.1
Proteína	6.9
Fibra cruda	9.8
Carbohidratos	53.6

En la Tabla 9, se muestra la información nutricional del chilate de formulación original, mientras que en la Tabla 10, se muestra la composición del chilate de formulación reducida en azúcar. Podemos observar que el aporte energético de una porción de 250 mL del chilate original es de alrededor de 163 kcal, mientras que la formulación con reducción de azúcar aporta 162 kcal. Aparentemente no es mucha la diferencia, sin embargo, tomando en cuenta que las personas pueden llegar a tomar hasta 3 porciones al día, ya significa un aporte calórico menor.

Haciendo una comparación entre el aporte calórico del chilate reducido en azúcar y el comercial líquido (etiqueta nutricional en Anexo VI), (162 kcal y 228 kcal, respectivamente), el aporte calórico de la formulación obtenida en este trabajo es menor, además de que la cantidad de proteína es mayor y la cantidad de azúcar menor que la reportada en la etiqueta de la bebida comercial.

**Tabla 9.** Información nutricional del chilate fórmula original.

<b>Tamaño de porción: 250 mL</b>	
<b>Porciones: 4</b>	
Contenido energético: 682 kJ (163 kcal)	
Proteína	3.4 g
Grasa (Lípidos)	4.5 g
Carbohidratos	27.5 g

**Tabla 10.** Información nutricional del chilate formulación reducida en azúcar.

<b>Tamaño de porción:</b> 250 ml	
<b>Porciones:</b> 4	
Contenido energético: 678 kJ (162 kcal)	
Proteína	3.5
Grasa (Lípidos)	4.6
Carbohidratos	26.8

En una encuesta realizada por Ojeda (2013), de los refrescos más consumidos en México, se encontró que el refresco Coca cola se encuentra en primer lugar, en cuya información nutrimental, se declara que una presentación de 600 mL aporta 252 Kcal, cuyo aporte se debe únicamente a su contenido en azúcar. Estas cifras ya son alarmantes, pero más aún, es que de 600 personas encuestadas, el 24% consume refresco diario, mientras que el 47% lo consume varias veces a la semana; además de que el 43% de los consumidores dicen tomar refresco en casa, lo que se vuelve un problema mayor, ya que es probable que todos los integrantes de la familia consuman refresco, incluyendo niños. Por otro lado, el aporte energético de jugos de frutas comerciales, como jugos del Valle o Jumex, es debido su contenido de azúcares, ambos sin aportes de grasa ni proteínas. En comparación con estas bebidas, que solo aportan carbohidratos, el consumo de chilate es preferible. Aun así, el aporte calórico del chilate es alto, por lo que pueden realizarse estudios más a fondo para disminuirlo, sin alterar su sabor original.

En las regiones de Guerrero, donde se consume el chilate, es muy común ver a señoras conocidas como “chilateras”, que lo venden en el tianguis o en las puertas de sus casas, estas bebidas son preparadas artesanalmente. Hasta hace poco, esta bebida empezó a comercializarse de manera industrial, en una presentación de 500 mL, en botella de plástico (Anexo IV) y se encontró en tiendas de autoservicio de la ciudad de Acapulco, también se encontró en el tianguis pasta de chilate en polvo (Anexo V), elaborada de manera artesanal por gente local. Se realizó una comparación de las características físicas (sabor, olor y color) de las muestras de chilate en pasta y comercial en polvo (Figura 18), donde se encontraron diferencias en todas las características analizadas, ya que la pasta en polvo presenta un color

más claro, en cuanto al olor y sabor se perciben mayormente notas de canela, en cambio, la muestra en pasta presenta color café fuerte, con olor y sabor a chocolate. En base a estas características y los resultados obtenidos del AQP del chilate en polvo (Tabla 11), donde se obtuvieron menores cantidades de grasa y de proteína; y un contenido mayor de fibra y de carbohidratos en comparación con el contenido de la pasta, podemos deducir que la muestra en polvo contiene menor cantidad de cacao y mayor cantidad de canela.



**Figura 18** Comparación entre chilate en pasta y chilate en polvo. Muestra A: Pasta de chilate, formulación reducida en azúcar; Muestra B: Chilate en polvo comercial.

**Tabla 11** Análisis Químico Proximal de la pasta de chilate en polvo

Componentes	%
Humedad	5.8 ± 0.05
Cenizas	1.03 ± 0.36
Grasa	4.01 ± 0.05
Proteína	9.00 ± 0.07
Fibra cruda	36.12 ± 5.53
Carbohidratos	49.85 ± 5.14

Los resultados se presan como el promedio ± la desviación estándar de tres determinaciones.

## **6.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

### **6.3.1 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES**

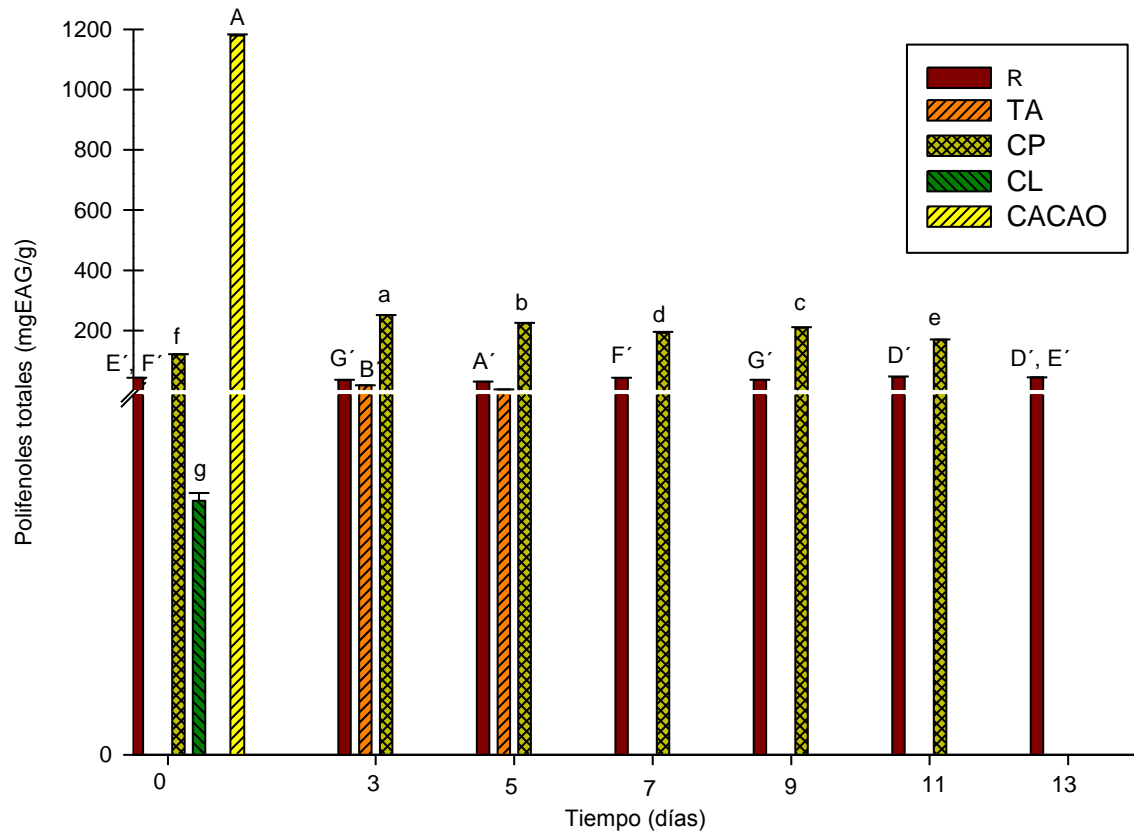
El contenido total de polifenoles, de todas las muestras en función del tiempo, se muestra en la Figura 19. La muestra control presentó la cantidad más alta de polifenoles ( $1179.53 \pm 3.99$  eqAG/g de muestra seca), presentando una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el resto de las muestras. Según Osakabe et al. (1998), mencionado por Othman et al. (2010), la concentración de epicatequina en los extractos de granos de cacao fueron alrededor de siete y diez veces mayor en comparación con el licor de cacao. Un estudio realizado por Nazaruddin et al. (2006), reveló que los granos de cacao no fermentados de Malasia contenían 1187 mg/100 g de epicatequina, mientras que los granos de cacao fermentados contenían solamente 985 mg/100 g. Cerca de 6-17 % de la epicatequina es degradada durante el proceso de fermentación. Sin embargo, la fermentación es un proceso importante para el desarrollo del color deseable y sabor en el cacao. Por otro lado Gu et al. (2006), encontraron una relación entre la concentración de procianidina y el contenido de sólidos de cacao sin grasa, en muestras de cacao y productos de chocolate, siendo el cacao natural en polvo, el que presentó más alto contenido de ambos y el chocolate con leche, el más bajo. Lo que demuestra que factores como la fermentación, la interacción entre los componentes del alimento, procesos de producción, etc., influyen seriamente en la concentración de polifenoles, a esto puede atribuirse la diferencia en la concentración entre la muestra control, con las muestras de chilate.

En cuanto a las muestras en pasta (R y TA), se observó una disminución en la concentración de polifenoles de  $43.50 \pm 0.26$  eqAG/g de muestra seca para el día 0, a  $4.50 \pm 0.03$  eqAG/g de muestra seca para el día 5 en la muestra TA, la muestra R presentó variaciones en la concentración durante el tiempo de almacenamiento, con una disminución del día 0 al día 5, después un aumento en el día 7, una disminución en el día 9 y un último aumento en el día 11, el cual permaneció sin variación significativa ( $p < 0.05$ ) hasta el final del monitoreo. La concentración final del día 13 no presentó diferencia significativa con la concentración inicial del día 0 ( $44.86 \pm 0.10$  y  $43.50 \pm 0.26$  eqAG/g de muestra seca, respectivamente).

Es difícil hacer una comparación directa de las concentraciones de polifenoles encontrados en nuestro experimento y aquellos reportados por otros autores, ya que la pasta de chilate está conformada por una matriz compleja de varios ingredientes, además de que las condiciones de extracción son diferentes, aun así, la tendencia de estos resultados fue similar con los obtenidos por Rivera et al. (2010), quienes reportaron que algunos fitoquímicos como ácido caféico y ferúlico en papaya, fueron considerablemente afectados por la temperatura y no por el tiempo de almacenamiento, ya que el almacenamiento en cámaras frigoríficas mantiene el contenido de fenoles en comparación con temperaturas más elevadas, sugiriendo una posible influencia de la combinación entre la temperatura y la etapa de madurez. También mencionan que bajo un periodo de almacenamiento, los fitoquímicos tienden a aumentar, debido a las condiciones de estrés a las que son sometidos los frutos o pulpas y posteriormente decrecen hasta estabilizarse. Se observó también que existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) sobre esta variable con respecto a la temperatura, siendo la muestra R, la que presentó mayor concentración de polifenoles en comparación con la muestra TA, dicho efecto puede deberse a la respuesta del material vegetal a la baja temperatura de almacenamiento por efecto de la síntesis de fitoalexinas (Piljac y Samec, 2011). En un estudio realizado por Chan et al. (2009), se demostró que el contenido de polifenoles totales aumentó alrededor de un 26% en muestras liofilizadas de hojas de *E. elatior*, en comparación con las hojas frescas. Lo que demuestra que las bajas temperaturas mantienen el contenido de polifenoles.

En cuanto a las muestras comerciales, la muestra CP fue la que presentó mayor concentración de polifenoles en el día 0 y día 11 ( $121.08 \pm 0.87$  y  $170.12 \pm 0.44$  eqAG/g de muestra seca, respectivamente), esto puede deberse a la influencia de los ingredientes presentes en la muestra, ya que se ha reportado que los compuestos activos (polifenoles) pueden interactuar con diversos componentes de su entorno, principalmente con proteínas y carbohidratos (Bulter, 1989; Jansman, 1993).





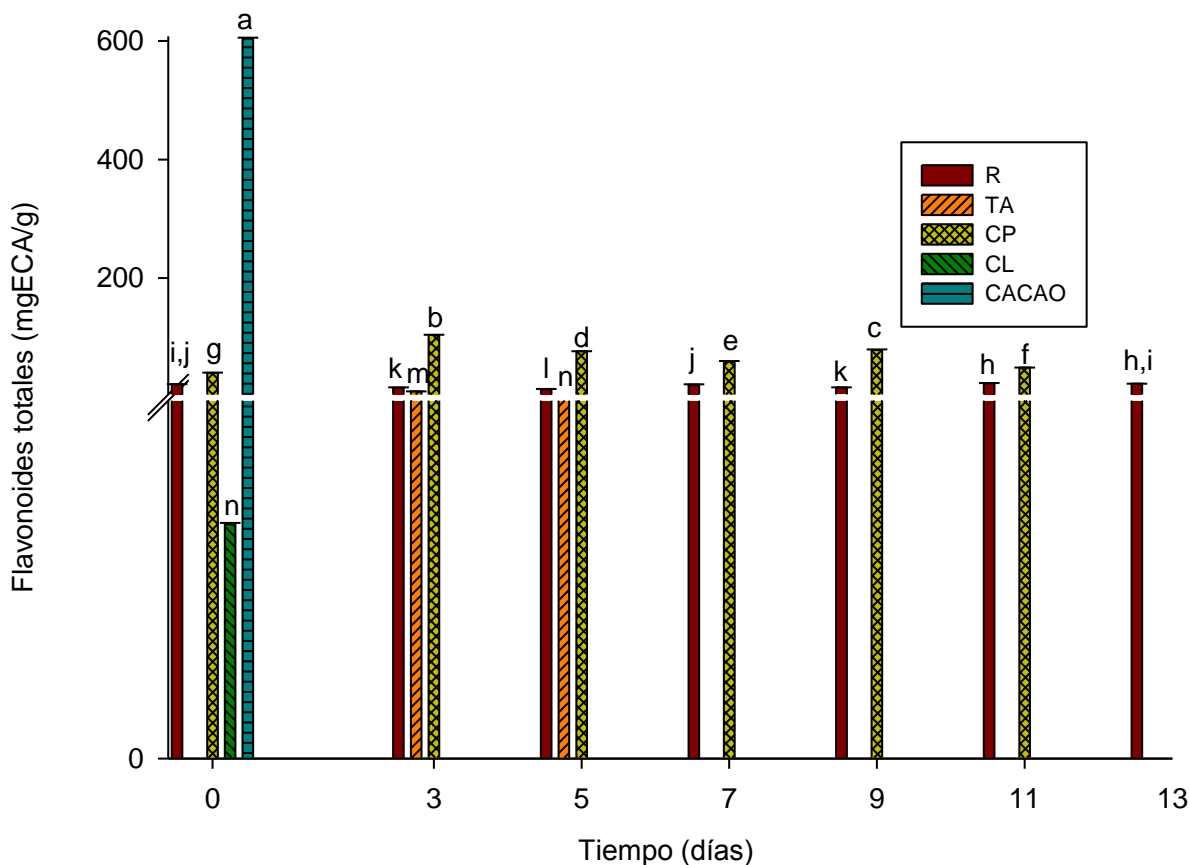
**Figura 19** Contenido total de fenoles

Muestra en Refrigeración (R), muestra a Temperatura Ambiente (TA), muestra Comercial en Polvo (CP), muestra Comercial Liquida (CL), Control (CACAO). Literales denotan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ): letra A diferencia en el contenido de polifenoles del control con todas las muestras; letras mayúsculas con apóstrofo indica diferencia en el contenido de polifenoles con respecto al tiempo entre las muestras R y TA; letras minúsculas indican diferencia en el contenido de polifenoles con respecto al tiempo entre las muestras CP y CL.

En este caso, aunque se realizó un fraccionamiento con acetato de etilo para descartar azúcares, cabe la posibilidad de que no se haya realizado una eliminación completa de estos, por lo que se pudieron haber cuantificado polifenoles que tuvieran afinidad por el azúcar, dando como resultado un alto contenido fenólico. Brčanovi et al. (2013), reportaron que un contenido menor de polifenoles en una muestra de chocolate de leche, con respecto a una muestra de chocolate en polvo, se debió a que la primera, contiene una cantidad más baja de licor de cacao, en comparación con la segunda. Esto puede explicar porque la muestra CL, fue la que presentó la menor concentración de polifenoles ( $2.11 \pm 0.06$  eqAG/g de muestra seca), ya que la presentación de la muestra es a base de agua y es difícil saber con exactitud la cantidad de cacao que contiene.

### **6.3.2 CUANTIFICACIÓN TOTAL DE FLAVONOIDES**

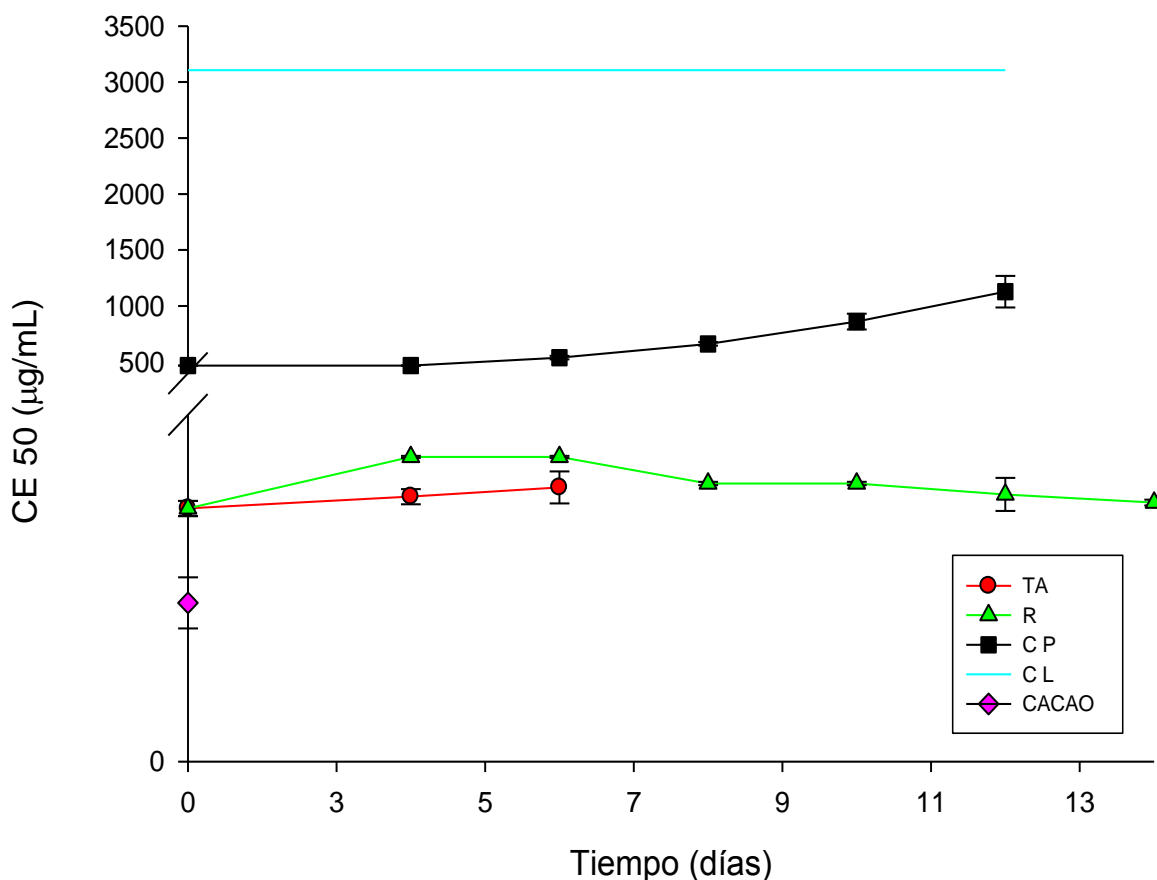
El orden descendiente de las concentraciones obtenidas de flavonoides totales fue: CACAO > CP > R > TA > CL (Figura 20). La muestra control presentó una concentración de  $603.69 \pm 1.85$  ECA/g de muestra seca. La muestra R, al igual que en el contenido de polifenoles, no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la concentración inicial (día 0) y la final (día 13) ( $20.54 \pm 0.66$  y  $22.00 \pm 0.17$  ECA/g de muestra seca, respectivamente). Con respecto a la muestra TA, esta presentó diferencias significativas en la concentración inicial (día 0) y la final (día 5) ( $20.54 \pm 0.66$  y  $2.17 \pm 0.15$  eq ECA/g de muestra seca, respectivamente), lo que demuestra que el almacenamiento a temperaturas de refrigeración, es el método más idóneo para conservar el contenido fenólico de la pasta de chilate. La muestra CP presentó una variación significativa en el contenido de flavonoides durante el tiempo de almacenamiento, presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones del día 0 y el día 11 ( $40.25 \pm 0.19$  y  $49.04 \pm 0.12$  ECA/g de muestra seca, respectivamente), mientras que la muestra CL, presentó la concentración más baja ( $1.30$  ECA/g de muestra seca). Esto indica que los flavonoides no son necesariamente los contribuidores principales del perfil total de polifenoles (Piljac y Samec, 2011).



**Figura 20.** Contenido total de flavonoides. Muestra en Refrigeración (R), muestra a Temperatura Ambiente (TA), muestra Comercial en Polvo (CP), muestra Comercial Liquida (CL), Control (CACAO). Literales denotan diferencia estadística ( $p < 0.05$ )

### 6.3.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

El control presentó mayor actividad de captura del radical DPPH  $18.30 \mu\text{g/mL}$  ( $CE_{50}$ ), aun así, no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la muestra R, la cual reportó una  $CE_{50}$  de  $29.18 \mu\text{g/mL}$  y  $29.86 \mu\text{g/mL}$  para los días 0 y 13 respectivamente y con la muestra TA se obtuvo una  $CE_{50}$  de  $29.18 \mu\text{g/mL}$  y  $31.60 \mu\text{g/mL}$  para el día 0 y día 5 respectivamente (Figura 21). Brčanovic et al. (2013), encontraron correlaciones bajas entre las catequinas totales y la capacidad antioxidante, en cambio el total de procianidinas presenta correlaciones mayores, lo que sugiere que las catequinas no son los contribuidores primarios para la capacidad antioxidante en cacao, mientras que las procianidinas son de mayor importancia.



**Figura 21.** Concentración eficiente ( $CE_{50}$ ) para la inhibición del radical DPPH de las muestras de chilate. Muestra en Refrigeración (R), muestra a Temperatura Ambiente (TA), muestra Comercial en Polvo (CP), muestra Comercial Liquida (CL), Control (CACAO). Literales denotan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en la concentración eficiente para la inhibición del radical DPPH de las muestras con respecto al tiempo.

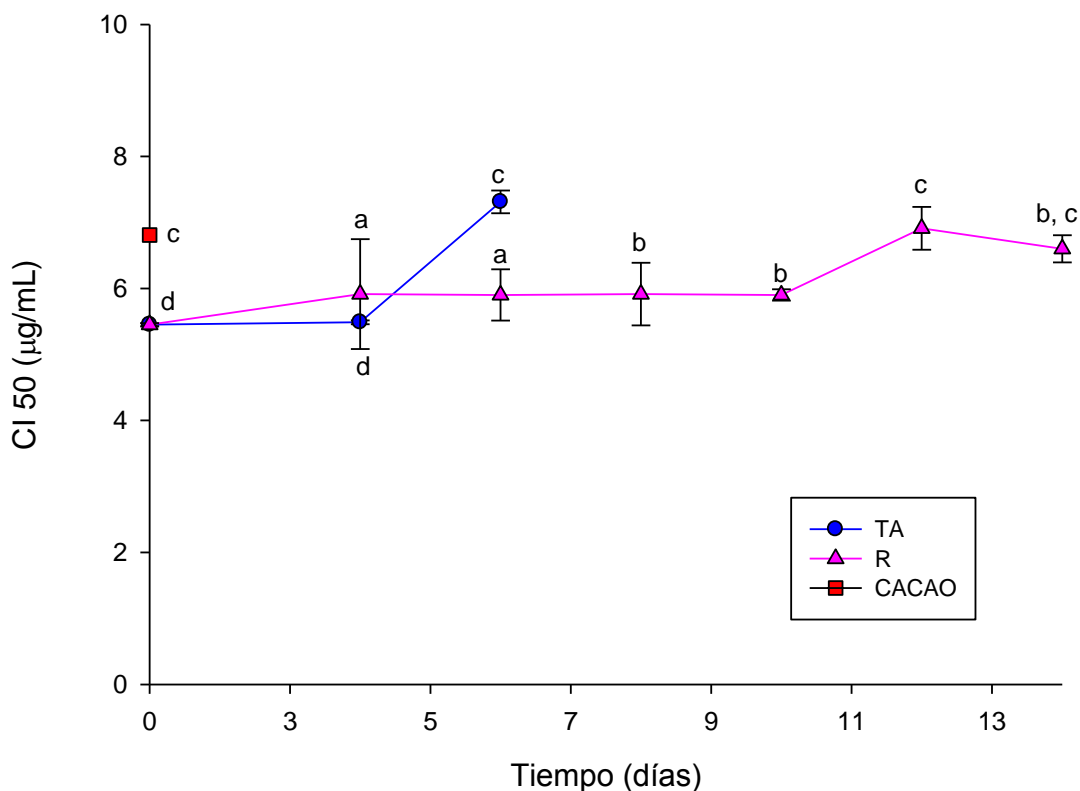
Adicionalmente, algunos autores indican que el tipo de compuesto fenólico, y el grado de polimerización, tienen un alto impacto sobre el estado antioxidante total (Rice Evans et al., 1995; Di Majo et al., 2008). Las principales procianidinas en cacao tienen un grado de polimerización de 2 – 10 (Adamson et al. 1999, Hammerstone et al. 2000). Las procianidinas predominantes en productos de cacao son dímeros B2 y B5, trímero C1 y A2 cinamtaninos (Cooper et al., 2008). Es probable que lo anterior explique que la muestra CACAO, haya presentado una mayor cantidad de polifenoles

en comparación con las muestras R y TA y que la actividad antioxidante sea muy similar entre las tres muestras.

En la Figura 21 se observa que la muestra CP no presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la actividad antioxidante entre los días 0 a 7 ( $CE_{50} = 467.66 \mu\text{g/mL}$  y  $661.22 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), pero del día 9 al 11 ( $CE_{50} = 860.40 \mu\text{g/mL}$  y  $1127.83 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) si las hay, presentando una disminución de la actividad antioxidante al final del monitoreo. Esta tendencia coincide con la obtenida en la concentración de flavanoides. También hubo diferencias con respecto a las demás muestras, probablemente, porque tenga una mayor cantidad de catequinas, sería necesario hacer un perfil fenólico de cada una de las muestras, en cada uno de los días de estudio, para saber con seguridad, cuáles son los compuestos que participan en la actividad antioxidante.

La muestra CL, fue la que presentó menor actividad antioxidante, obteniendo un valor de  $CE_{50}$  de  $3105.74 \mu\text{g/mL}$ . Este resultado puede relacionarse con su concentración de polifenoles, ya que fue esta muestra en la que se encontró la menor concentración de todas.

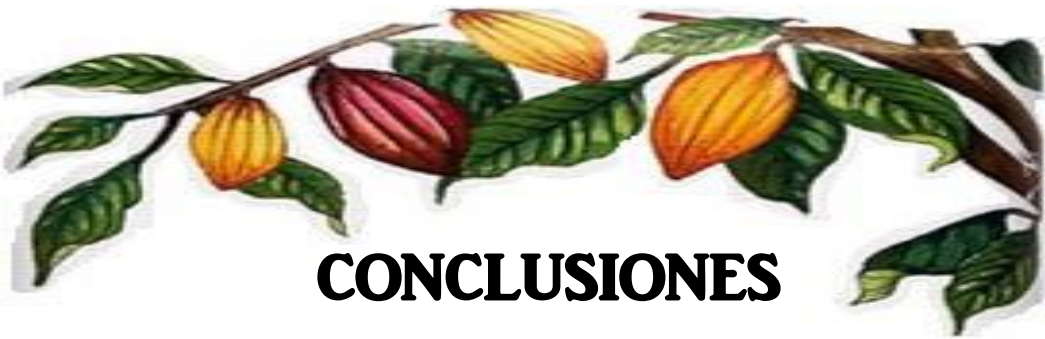
Los resultados del ensayo de inhibición de peroxidación lipídica, se muestran en la Figura 22, donde se observó que la muestra R inhibió el 50% de la oxidación con una  $CI_{50}$  de  $5.45 \mu\text{g/mL}$  en el día 0 y  $6.60 \mu\text{g/mL}$  para el final del tiempo de almacenamiento, lo que supone una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la disminución de la actividad antioxidante entre el primer día y el último, en cuanto a la muestra TA de igual forma presentó una disminución de la actividad antioxidante del día 0 al día 5 ( $CI_{50} = 5.45 \mu\text{g/mL}$  y  $7.31 \mu\text{g/mL}$  respectivamente). El control presentó una actividad menor que las muestras anteriores  $6.80 \mu\text{g/mL}$  ( $CI_{50}$ ). En el caso de las muestras CP y CL se observaron un porcentaje de inhibición de oxidación lipídica del 95% a una concentración de 100 ppm desafortunadamente ya no se pudo determinar la  $CI_{50}$ . Cabe mencionar que es mejor la capacidad antioxidante de un extracto cuando requieren de una menor concentración para alcanzar un mayor porcentaje de inhibición de la oxidación de la LDL. El que las muestras R y TA, hayan presentado una actividad mayor que el control, puede deberse al aporte de polifenoles de los demás ingredientes (arroz y canela).



**Figura 22.** Concentración de Inhibición de la oxidación de las LDL ( $CI_{50}$ ) de las muestras de chilate. Muestra en Refrigeración (R), muestra a Temperatura Ambiente (TA), muestra Comercial en Polvo (CP), muestra Comercial Liquida (CL), Control (CACAO). Literales denotan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) en la concentración de inhibición de la oxidación de las LDL de las muestras con respecto al tiempo.

Zajdel et al. (2013), realizaron un estudio *in vitro*, en donde utilizaron ácido fítico de arroz y comprobaron, que este tiene una potente capacidad antioxidante y que además, actúa como inhibidor de la formación del radical hidroxilo, catalizada por hierro. Estudios previos demostraron que la canela exhibió actividades antioxidantes más altas en comparación con las de otras especias (Murcia et al., 2004).

A pesar de que la muestra CP, presentó la mayor concentración de fenoles y flavonoides durante todo el tiempo de almacenamiento, no fue la que presentó mayor capacidad antioxidante de las muestras de chilate, en cambio las pastas R y TA, independientemente de la temperatura de almacenamiento, presentaron muy buena capacidad antioxidante, incluso mejor que el control CACAO, lo que puede deberse a una sinergia entre los componentes de los ingredientes.



## CONCLUSIONES

## **7 CONCLUSIONES**

1.- Con la prueba de análisis sensorial, se demostró que la cantidad de azúcar, influye significativamente en el sabor del chilate, ya que la formulación con menor cantidad de esta, fue la menos aceptada por los consumidores. Ya que no hubo diferencia significativa entre la muestra original y la muestra con reducción de 100 g de azúcar, se tomó esta segunda para su caracterización y análisis de capacidad antioxidante.

2.- Se puede considerar al chilate como un alimento completo, ya que tiene un aporte de proteínas, grasa, fibra cruda y carbohidratos. También se observó una reducción en el aporte calórico de la formulación elegida en la prueba sensorial, que es menor, incluso que la muestra de chilate líquida comercial y de los refrescos y bebidas azucaradas consumidas principalmente en México.

3.- En cuanto a la capacidad antioxidante, se observó que la pasta contiene un alto contenido de polifenoles y una buena capacidad antioxidante, en comparación con las muestras comerciales de chilate, al igual que se comprobó que las mejores condiciones para la conservación de la capacidad antioxidante de la pasta fue a temperaturas de refrigeración.



## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G. H. (1999). HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 47 (4) 184–88
- Adeyeye, E. I., Akinyeye, R. O., Ogunlade, I., Olaofe, O., Boluwade, J. O. (2010). Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. *Food Chem.* 118 357–363
- Adrogué, H. J., Madias, N. E. (2007). Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med.* 356 (19) 1966-1978
- Álvarez, C., Pérez, E., Lares, C. M. (2007). Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, estado Aragua. *Agr. Trop.* 57 (4) 249-256
- Antolovich, M., Prenzier, P., Robards, K., Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst.* 125 989-1009
- Arai, S., Osawa, T., Ohigashi, H., Yoshikawa, M., Kaminogawa, S., Watanabe, M., Ogawa, T., Okubo, K., et al. (2001). A mainstay of functional foods science in Japan-History, present status, and future outlook. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 1-13
- Arts, I. C. W.; Hollman, P. C. H., Kromhout, D. (1999). Chocolate as a source of tea flavonoids. *The Lancet.* 354, 488
- Arts, I. C. W., van de Putte, B., Hollman, P. C. H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* 48 1746-1751
- Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.* 32 671-683
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99 191-203
- Baran, R. /et al./ (1997). Changes in phenolic compounds and colour in pole cherry wines subjected to fining treatment. *Zlebinen Unterss Forsch A- Foo.* 205 (6) 474-478
- Barquera, S., Hernandez, B. L., Tolentino, M. L., Espinosa, J., Ng, S. W., Rivera, J. A., Popkin, B. M. (2008). Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults. *J Nutr.* 138 2454–61
- Barquera, S., Campirano, F., Bonvecchio, A., Hernández, B. L., Rivera, J. A., Popkin, B. M. (2010). Caloric beverage consumption patterns in Mexican children. *J. Nutr.* 9 1-47
- Bertrán, M. (2005). Cambio alimentario e idnetidad de los indígenas mexicanos. México, Publicaciones y Fomento Editorial-UNAM.
- Bisson, J. F., Nejdí, A., Rozan, P., Hidalgo, S., Lalonde, R., Messaoudi, M. (2008). Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats. *B. J. Nutr.* 100 (1) 94–101
- Box, H. C., Dawidzik, J. B., Budzinski, E. E. (2001). Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radic Biol Med.* 31 (7) 856-868.

- Brand, W. W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wissen Technol.* 28 25–30
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutrition reviews.* 56 317-333.
- Brcanovi, J. M., Pavlovi, A. N., Miti, S. S., Stojanovi, G. S., Manojlovi, D. D., Kalicanin, V. M., Veljkovi, J. N. (2013). Cyclic Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity of Cocoa Powder, Dark Chocolate and Milk Chocolate Samples: Correlation with Spectrophotometric Assays and Individual Phenolic Compounds. *Food Technol. Biotechnol.* 51 (4) 460–470
- Bulter, L. G. (1989). Effect of condensed tannin on animal nutrition. In Hemingway, R. W. y Karchesy, J. J. (eds.) *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, Plenum Press. New York. 391-402
- Cai, Y. Z., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74 2157–2184
- Camara, H. M., Sanchez, M. M. C., Torija, I. M. E. (2003). *Frutas y verduras, fuente de salud*, Colección Nutrición y salud, Grupo Elba, Madrid.
- Camarena, G. D. M., Sandoval, G. S. A., Dominguez, I. S. E. (2011). Actitud hacia el consumo de comidas étnicas/internacionales y tradicionales en el norte de México. *Agroalimentaria.* 17 87-97
- Calderón, S. J. (2004). El efecto del Tratado de Libre Comercio de América del Norte y del Tratado de Libre Comercio México-Unión Europea en la agricultura mexicana. En: M. C. Valle, R. (Ed). *El Desarrollo agrícola y rural del Tercer Mundo en el contexto de la mundialización.* pp. 141-164 Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=PyB8Y8OhqTWC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=PyB8Y8OhqTWC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, S. K., Lim, K. K., Tan, S. P., Lianto, F. S., Yong, M. Y. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chem.* 113 166–172
- Cooper, K. A., Campos-Gimenez, E., Alvarez, D. J., Nagy, K., Donovan, J. L., Williamson, G. (2007). Rapid reverse-phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationship of their concentration in chocolate. *J. Agric. Food Chem.* 55 2841-2847
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., Williamson, G. (2008 a). Cocoa and health: a decade of research. *Bri. J. Nutr.* 99 1-11
- Cooper, K. A., Campos-Gimenez, E., Álvarez, D. J., Rytz, A., Nagy, K., Williamson, G. (2008 b). Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. *J. Agric. Food Chem.* 56 260–65
- Córdova-Villalobos, J. A., Barriguete-Meléndez, J. A., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., De León-May, M. E., Aguilar-Salinas, C. A. (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Publica Mex.* 50 419-427
- Dennis, K. J., Shibamoto, T. (1989). Gas Chromatographic determination of malonaldehyde formed by lipid peroxidation. *Free Radical Biol. Med.* 7 187-191
- Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., Giammanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *J. Food Chem.* 111 45-49
- Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X., Girotra, S. (2006). Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr. Metabol.* 3 (2)

- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br. J. Nutr.* 81, S1-S27
- Dixon, S. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7 1085-1087
- Escalante, G. P. (2004). El Mexico Antiguo. En: Escalante, G. P., Garcia , M. B., Jáuregui, L., Vazquez, J. Z., Speckman, G. E., Garciadiego, J., Áboites, A. L. (Eds.), *Nueva Historia Mínima de Mexico.* 11-57 Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=UMuV8kR5ydYC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=UMuV8kR5ydYC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012). Resultados Nacionales. Primera edición. Recuperado de: [http://ensanut.insp.mx/informes.php#.Vd491vl\\_Oko](http://ensanut.insp.mx/informes.php#.Vd491vl_Oko) (15 de agosto del 2015)
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Natale, de A., Pollio, A. (2009). Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia.* 80 (5) 255–262
- Fomento Económico Mexicano S.A: Informe anual FEMSA 2000. Monterrey NL; 2000.
- Fridovich, I., (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264 7761-7764
- Fridovich, I. (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N.Y .Acad. Sci.* 893,13
- García, P. M. C. (2008) Antioxidantes en la dieta mediterranea. *Nutrición Clínica en Medicina* 3 129–140
- García, R. E. (2006). *Cocina Prehispánica Mexicana.* Recuperado de <http://books.google.com.mx/books?id=EJuKSkd5K94C&printsec=frontcover&dq=cocina+prehispanica+mexicana&hl=es-419&sa=X&ei=SHkzUbWeB-WZ2QWQ44DICQ&ved=0CCsQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false> (2 de marzo del 2013)
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. (2001) Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40 959-975
- Gomez, R. M. (2010). Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales (Tesis doctotal) Universidad de Granada, España.
- Goufo, P., Trindade, H. (2013). Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, c-oryzanol, and phytic acid. *Food Sci. Nutr.* 2 (2) 74-104
- Grupo CONVERGE. (2007). Diagnóstico y tratamiento del riesgo cardiometabólico. *Med Clin (Barc).*129 (15) 588-96
- Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., Prior, R. L. (2006). Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4057–4061
- Gul, S., Safdar, M. (2009). Proximate Composition and Mineral Analysis of Cinnamon. *J. Nutr* 8 (9) 1456-1460
- Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Öİ, Aslan, A. (2002) Determinations of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *J Ethnopharmacol* 79 325–329

- Gülçin, İ., Büyükkokuroğlu, M. E., Oktay, M., Küfrevioğlu Ö.İ. (2003) Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. Subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *J Ethnopharmacol* 86 51–58
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu Ö.İ., Oktay, M., Büyükkokuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol* 90 205–215
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol* 86 345-391
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Schmitz, H. H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J. Nutr.* 130 S2086–92
- Handelman, G. J., Cao, G., Walter, M. F., Nightingale, Z. D., Paul, G. L., Prior, R. L., Blumberg, J. B. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4888-4893
- Hearnly, J. M., Bhagwat, S., Lin, L. Z. (2007) Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 47-61.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M., Romani, A. (2005). Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. Dry beans. *J. Agric. Food. Chem.* 53 (8) 3053-3056
- Henle, E., Linn, S. (1997). Formation, Prevention, and Repair of DNA Damage by Iron/Hydrogen Peroxide. *J. of Biol. Chem.* 1909-1909
- Herrero, M., Ibañez, E., Cifuentes, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *J. Sep. Sci.* 28 883-897.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53 1841–1856
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2013). “Índice de precios”. Recuperado de: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/inp/Default.aspx>. (15 de agosto del 2015)
- Iqbal, S., Bhangar, M. I., Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chem.* 2, 265-272
- Jalil, A. M. M., Ismail, A. (2008). Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health?. *Molecules.* 13 2190-2219
- Jansman, A. J. M. (1993). Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. *Nutr Res Rev.* 6 209-236
- Jayaprakasha, G. K., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Rao, L. J. (2006). Phenolic constituents in the fruits of *Cinnamomum zeylanicum* and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 54 1672-1679
- Kakkar, S., Bais, S. (2014). A review on protocatechuic acid and its pharmacological potencial. *Hindawi*, 2014, 1-9. 26/09/2015, De ISRN Pharmacology Base de datos.
- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., Prior, R. L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4638–4644
- Katz, D. L., Doughty, K., Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidant and Redox Signaling.* 15 (10) 2779–2811

- Kawak, N. S., Jukes, D. J. (2001), Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*. 12, 109-117.
- Kelm, M. A., Johnson, J. C., Robbins, R. J., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. (2006). High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *J. Agric. Food Chem.* 54 1571-1576
- Khokhar, S., Apenten, R. K. O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative-structure activity relations. *Food Chem.* 81 133-140
- Kofink, M., Papagiannopoulos, M., Galensa, R. (2007). (-)-Catechin in cocoa and chocolate: Occurrence and analysis of an atypical Flavan-3-ol enantiomer. *Molecules*. 12 1274-1288
- Lares, A. M. C., Gutiérrez, R., Pérez, E., Álvarez, C. (2012). Efecto del tostado sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, composición proximal y perfil de ácidos grasos de la manteca de granos de cacao del estado Miranda, Venezuela. *Revista Científica UDO Agr.* 12 (2) 439-446
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food. Chem.* 51 7292-7295
- León, O. S., Martínez, G., García, I., Bilbao, T., Ledesma, L. (2004). Balance Antioxidante/Prooxidante: Salud y enfermedad. 1ra. Edición.
- Loy, S., Simón, R., Delgado, R. (2002). VIMANG, un potencial protector de la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 21 (3) 167-170.
- Luthria, D., (2006). Significance of samples preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. *J. Sci. Food Agric.* 86 2266-2272
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* 613 1-19
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 727-747
- Martínez, F. S., Gonzalez, G. J., Culebras, J. M., Tuñón, J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17 271-278
- Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M. C. (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensm-Wiss. U.-Technol.* 31, 694-698
- Menchú, M. T., Méndez, H. (2007). *Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica*. Guatemala: INCAP/OPS
- Murcia, M. A., Egea, I., Romojaro, F., Parras, P., Jimenez, A. M., Martínez-Tome, M., (2004). Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.* 52 (7) 1872-1881
- Naczek, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1523-1542
- Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T., Yoshida, T. (2000). Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64 (12) 2581-2587
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Ind. Crops Prod.* 24 87-94

- Neilson, A. P., Ferruzzi, G. (2011). Influence of formulation and processing on absorption and metabolism of Flavan-3-Ols from tea and cocoa. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2 125–151
- Nelson, B. C., Sharpless, K. E. (2003). Quantification of the predominant monomeric catechins in baking chocolate standard reference material by LC/APCI-MS. *J. Agric. Food Chem.* 51, 531-537
- Newell, G. J., MacFarlane, J. D. (1987). Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *Journal of Food Science.* 52 1721
- Ohama, H., Ikeda, H., Moriyama, H. (2006). Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology.* 221, 95-111
- Ojeda, E. (2013). Estudio de Mercado sobre consumo de Refresco en México. Recuperado de: <https://mexico.febbo.com/blog/estudio-de-mercado-sobre-consumo-de-refresco-en-mexico/> (20/10/2015)
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 100, 1523-1530
- Othman A., Jalil, A. M. M., Weng, K. K., Ismail, A., Ghani, N. A., Adenan, I. (2010). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (7) 1052-1059
- Panorama de la seguridad alimentaria y nutrimental en México 2012. FAO 2013.
- Parr, A. J., Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* 80 985-1012
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Río, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nut.* 133 2812–2819
- Pérez, E. R., Obbagy, J. E., Altman, J. M., Essery, E. V., McGrane, M. M., Wong, Y. P. et al. (2012). Dietary energy density and body weight in adults and children: a systematic review. *J Acad Nutr Diet.* 112 (5) 671-684
- Perez, J. J., Saura, C. F. (2005) Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J Agric Food Chem.* 53 5036–5040
- Peters, C. M., Green, R. J., Janle, E. M., Ferruzzi, M. G. (2010). Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea. *Food Res. Int.* 43 95–102
- Pettipher, G. L. (1986). Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium. *J. Sci. Food Agric.* 37 297-309
- Pietta, P., Minoggio, M., Bramati, L. (2003). Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. *Stud , Nat. Prod. Chem.* 28, 257-312
- Piljac-Zegarac, J., Samec, D. (2011). Antioxidant stability of small fruits postharvest storage at room and refrigerator temperatures". *Food Res Int.* 44 345-350
- Popkin, B. M., Adair, L. S., Ng, S. W. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev.* 70 3–21
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 53 4290–4302

- Rice-Evans, C. (1997). Antioxidant properties of phenolic compound. *Trends Plant Sci.* 2 152-159
- Rivera, J. A., Muñoz, H. O., Rosas, P. M., Aguilar, S. C. A., Popkin, B. M., Willett, W. C. (2008). Beverage consumption for a healthy life: recommendations for the Mexican population (in Spanish). *Salud Publica Mex.* 50 173–95
- Rivera, P. D., Yahia, E., Gonzalez-Aguilar, G. (2010). Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage *J Sci Food Agric.* 90 2358-2365
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: European perspectives. *Br. J. Nutr.* S133-S138
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: and overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51 2866-2887
- Román, S., Ojeda-Granados, C., Panduro, A. (2013). Genética y evolución de la alimentación de la población en México. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 21 42-51
- Sathyapalan, T., Beckett, S., Rigby, A. S., Mellor, D. D., Atkin, S. L. (2010). High cocoa polyphenol rich chocolate may reduce the burden of the symptoms in chronic fatigue síndrome. *Nutrition Journal.* 9 (1) 55
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémséy, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287-306
- Sevanian, A., Ursini, F. (2000). Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic. Biol. Med.* 29 306-311
- Shimizu, T. (2003). Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. *Nutr. Res. Rev.* 16, 241-252
- Silveira, R. M. B., Monereo, M. S., Molina, B. B. (2003). Alimentos funcionales y nutricion optima. ¿Cerca o lejos?. *Rev. Esp. Salud Pública.* 77, 317-331
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16 144–158
- Song, F. L., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., Li, H. B. (2010). Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *Int J Mol Sci* 11 2362–2372
- Soria, S. G., Palacio, M. V. H. (2014). El Escenario Actual de la Alimentación en México. *Textos & Contextos (Porto Alegre).* 13 128-142
- Southorn, P. A., Powis, G. (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic. Proc.* 63 381-389
- Stadtman, E. R., Oliver, D. N. (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266 2005-2008
- Stadtman, E. R., Levine, R. L. (2000). Protein Oxidation *Ann. NY Acad. Sci.* 899 (1) 191–208
- Stalikas, D. C. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30, 3268-3295
- Stark, T., Bareuther, S., Hofmann, T. (2005). Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) and structure determination of taste-active polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5407-5418

- Stern, D., Piernas, C., Barquera, S., Rivera, J. A., Popkin, B. M. (2014). Caloric Beverages Were Major Sources of Energy among Children and Adults in Mexico. *J. Nutr.* 1999–2012
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *J. Nutr.* 2, 1231-1246
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology.* 7 65-74
- Verschuren, P. M. (2002). Functional foods: scientific and global perspectives. *Br. J. Nutr.* 88, 125-130
- Vinson, J., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J. (2005). Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J Am Coll Nutr* 24 44–50
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás, B. F. A., Dalta, N., Singanusong, R., Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits, *Plant Foods Hum. Nutr.* 59, 113-122.
- Yngve, A., Haapala, I., Hodge, A., McNeill, G., Tseng, M. (2012). Making soft drinks the dietary version of the cigarette. *Public Health Nutr;* 15 1329–30
- Yun-Zhong, F., Sheng, Y., Guoyao, Wu. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872- 879.
- Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E., Elías, L. G. (1992). Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa, Canadá. Pp 70-73 Recuperado de <http://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/12666/1/IDL-12666.pdf>
- Wollgast, J., Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* 33 423-447
- Zajdel, A., Wilczok, A., Weglarz, L., Dzierzewicz, Z. (2013). Phytic Acid Inhibits peroxidation In Vitro. *BioMed. Res. Inter.* Article ID 147307



## 9 Anexos

### Anexo I

12 posibilidades diferentes de servir la muestra	
570, 480, 310, 640	570, 310, 640, 480
570, 640, 480, 310	480, 310, 640, 570
480, 640, 570, 310	480, 570, 310, 640
310, 640, 570, 480	310, 570, 480, 640
310, 480, 640, 570	640, 570, 480, 310
640, 480, 310, 570	640, 310, 570, 480

### Anexo II

Fecha:	Edad:	Género:	
Frente a usted tiene cuatro formulaciones diferentes de la misma bebida. Evalúe por favor las cuatro muestras que se le presentan, de izquierda a derecha. Ordene las claves en los espacios de forma que la clave de la muestra que más le guste irá en el espacio número 1 y así sucesivamente hasta que la muestra que menos le agrade ocupe el lugar número 4. No olvide tomar agua para enjuagar la boca después de cada muestra.			
1: _____	2: _____	3: _____	4: _____
<b>Comentarios:</b>			
<b>¡Muchas gracias!</b>			

### Anexo III

Diferencias Críticas Absolutas de la Suma de Rangos para las Comparaciones de “Todos los Tratamientos” a un Nivel de Significancia de 5%

Panelistas	Número de muestras									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	6	8	11	13	15	18	20	23	25	28
4	7	10	13	15	18	21	24	27	30	33
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	39	43	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	26	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	66
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	58	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	66	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	68	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	86	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	55	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	88	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	33	42	52	62	72	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	85	96	107	118
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112	124
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117	130
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131	145
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144	159
95	33	46	60	74	88	103	118	133	148	163
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151	167

<sup>a</sup> Los valores exactos adaptados de Hollander y Wolfe (1973) se usan en pruebas de hasta 15 panelistas.

<sup>b</sup> Se pueden hallar por interpolación los valores no especificados en la tabla cuando participen más de 50 panelistas.

## Anexo IV

### Chilate liquido comercial



## Anexo V

### Chilate en polvo comercial



## Anexo VI

### Información nutricional del chilate comercial

Información Nutricional	
Tamaño de la Porción: 250 ml	
Porciones por Envase: 2	
Contenido energético: 968 kJ (228 kcal)	
Proteínas:	2 g
Grasas (Lípidos):	4 g
Carbohidratos (Hidratos de Carbono)	46 g
Sodio	7 mg