



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Extracción y cuantificación de cafeína y teobromina en granos de cacao

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

PRESENTA

Lesli Norma González Nuñez



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruiz
Vocal	Dra. Josefina Elizalde Torres
Secretario	Dra. Ma. del Pilar Cañizares Macías
1er. Suplente	M. en C. Lucía Hernández Garciadiego
2º. Suplente	M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera

Sitio donde se desarrolló en tema:

Laboratorio 105 Y 106. Departamento de química analítica. División de estudios de posgrado. Edificio B. Facultad de Química. UNAM.

Asesor:

Dra. Maria del Pilar Cañizares Macías.

Sustentante:

Lesli Norma González Nuñez

A mis PADRES:

Reyna y Cornelio , gracias porque sin su apoyo y su gran esfuerzo tal vez no hubiese podido realizar este maravilloso sueño.

A mis hermanos:

Eva, por ser el pilar más importante en toda mi vida, por ser el ejemplo más grande de victoria a seguir y por todo tu esfuerzo a lo largo de estos años de mi formación, nunca podré pagarte tanta satisfacción personal, gracias.

Jesús, Arturo, Ana, Cornelio, Araceli, porque cada uno de ustedes son un eslabón en mi vida y sin su participación, apoyo y paciencia no hubiese logrado este mérito, los ama su hermana.

A mi Tutora, la Dra. Ma. del Pilar Cañizares Macías, por haberme dado la oportunidad de superarme y haberme guiado durante todo este proyecto, por su gran paciencia y esfuerzo por sacarme adelante, con gran admiración, le agradezco.

A Pedro Villanueva, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con el y por ser un gran amigo.

A Piotr Álvarez por que tú has sido un eje en este proyecto, por que me enseñaste lo bueno de la vida escolar y que la calidad es el principio de todo proyecto exitoso, por todo tu apoyo a lo largo de la licenciatura y por toda tu infinita paciencia en este tan maravilloso trabajo de investigación.

A los miembros del jurado por tener la convicción de replantear mi escrito de tesis y por haberme brindado la oportunidad de mejorar este trabajo.

A mi mejor amiga, Marisol por todas las buenas y malas experiencias que vivimos juntas, más que una amiga en este momento eres una hermana más, gracias por permitirme ser tu latosa amiga en toda la licenciatura, por tu apoyo y por que este logro sabes que nos pertenece.

A Miguel, Rodrigo, Jesús, Mauri, Fidel, Elena, Adalith, por ser los mejores amigos en la facultad y que espero seguir conservando.

A mis grandiosas compañeras de laboratorio, Lidia y Maru, porque viví una experiencia hermosa a su lado espero la vida nos preste la oportunidad de seguir tratándonos, gracias por su paciencia.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
II.1 Objetivo general	4
II.2 Objetivos particulares	4
III. ANTECEDENTES	5
III-1 Cacao	6
III-1.1 Calidad intrínseca y física del grano de cacao	6
III-1.2 Variedades del cacao	7
III-1.2.1 El cacao criollo	7
III-1.2.2 El cacao forastero	7
III-1.2.3 El cacao trinitario	7
III-1.3 Composición y producción mundial del grano de cacao	8
III-1.4 Fermentación.....	9
III-2 Características de la teobromina y la cafeína	10
III-3 Métodos de análisis.....	12
III-4 Métodos de extracción.....	12
III-4.1 Extracción sólido-líquido.....	12
III-4.2.Extracción asistida con microondas focalizadas.....	13

IV. METODOLOGÍA	18
IV-1 Reactivos y disoluciones.....	19
IV-2 Equipo.....	20
IV-3 Tratamiento de las muestras	20
IV-4 Métodos de extracción	21
IV-4.1 Método de extracción por agitación (MI)	21
IV-4.2 Método de extracción por reflujo (MII)	22
IV-4.3 Método de extracción por agitación propuesto (MIII)	22
IV-4.4 Método de extracción por microondas focalizadas (EAMF)	23
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS	24
V-1 Selección del método de detección	25
V-1.1 Determinación de la longitud de onda de máxima absorción para teobromina y cafeína	25
V-1.2 Elaboración de las curvas de calibración.....	26
V-2 Parámetros de evaluación del beneficio del grano de cacao.....	28
V-2.1 Determinación del contenido de humedad, grasa, tamaño y pH.....	28
V-3 Evaluación de los métodos de extracción por agitación	30
V-3.1 Análisis estadístico entre los métodos	31
V-3.2 Prueba de <i>F</i>	32
V-3.3 Prueba de <i>t</i> student	32
V-4 Precisión de MIII	33
V-4.1 Precisión.....	33
V-5 Evaluación de los métodos de extracción.....	34
V-5.1 Porcentaje de recobro	34
V-5.2 Evaluación del efecto de la muestra (grano de cacao)	35

V-6 Estudio de la optimización para el método de extracción asistida con microondas focalizadas propuesto	37
V-6.1 Estudio factorial 2^3	37
V-6.2 Gráfico de pareto	39
V-6.3 Gráfico de superficie de respuesta	41
V-6.4 Análisis de varianza de la EAMF para el diseño experimental 2^3	44
V-7 Cuantificación de TB y CF en grano desengrasado.....	45
V-8 Evaluación de algunos parámetros de validación de la EAMF.....	47
V-8.1 Porcentaje de recobro	47
V-8.2 Precisión.....	48
V-8.3 Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio	48
V-9 Comparación de los métodos de extracción (EAMF vs MIII)	51
V-9.1 Prueba de F	52
V-9.2 Prueba de t student	54
VI. CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXO I	61

ABREVIATURAS

TB	Teobromina
CF	Cafeína
MI	Metodología I
MII	Metodología II
MIII	Metodología III
EAMF	Extracción asistida por microondas focalizadas
ANOVA	Análisis de varianza
DER	Desviación estándar relativa

INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

El cacao, es el fruto extraído de las mazorcas maduras de los árboles de la especie *Theobroma cacao*, para su consumo en la industria alimenticia éste tiene que encontrarse fermentado y seco. Se cultiva principalmente en el Oeste de África, América Central, Sudamérica y Asia. El cacao debido a su sabor y aroma es el principal ingrediente utilizado en la industria alimentaria y en la cosmética.

La Teobromina (TB) se encuentra principalmente en las semillas de la planta del cacao. Es un estimulante del sistema nervioso central, así como de las funciones renales; actúa acelerando la transmisión del influjo nervioso y reduce el tiempo de reacción de los nervios periféricos facilitando el esfuerzo cardíaco. Por otra parte, la TB presenta relevancia para la industria farmacéutica debido a que esta presenta un efecto estimulante sobre el SNC de baja intensidad comparada con la cafeína, su aplicación radica en la fabricación de fármacos con propiedades diuréticas. La Cafeína (CF) es una sustancia que se encuentra también en la semilla de cacao pero en menor cantidad y tiene propiedades similares a la teobromina.

En este trabajo se determinó teobromina y cafeína en diferentes muestras de cacao y sus derivados. Estas dos moléculas al ser de estructura molecular muy similar requieren de la optimización de un método analítico que sea confiable, reproducible y económico que permita su extracción, separación y cuantificación.

La extracción de los analitos de una muestra es parte fundamental en el pre-tratamiento del análisis, por lo tanto en los últimos años ha destacado el estudio de nuevas técnicas de extracción en donde haya: 1) disminución de los volúmenes de disolventes orgánicos, lo que favorece la reducción en la generación de residuos contaminantes; 2) reducción en los tiempo de extracción; 3) una disminución en los costos de reactivos y; 4) aumento de la eficiencia de extracción.

Para la extracción de TB y CF se han utilizado diferentes métodos, sobresaliendo la extracción por Soxhlet (que es eficiente, pero tiene la desventaja de tiempos de extracción muy largos), y la extracción sólido-líquido asistida con agitación, esta última es más rápida y presenta resultados similares a la extracción por Soxhlet.

En este trabajo se desarrollo un método de extracción con microondas focalizadas para extraer la TB y CF de semillas curadas de cacao, la cáscara de éste y cocoa en polvo; para el diseño del método se optimizó previamente un método de extracción sólido-líquido asistida con agitación y los resultados se compararon entre metodologías.

Los resultados mostraron que con la extracción asistida por microondas focalizadas la eficiencia de la extracción para TB aumentó un 9.03% para el grano de cacao, 68.0% para la cáscara y un 32.07 % para la cocoa en polvo; para CF la eficiencia aumento un 150% para el grano de cacao, 35.21% para la cáscara y un 43.80 % para la cocoa en polvo, en comparación con la extracción asistida con agitación.

II.- OBJETIVOS

II-1 Objetivo General

- Proponer, desarrollar y evaluar un método para la extracción de teobromina y cafeína en grano de cacao utilizando microondas focalizadas para su cuantificación por espectrofotometría ultravioleta.

II-2 Objetivos particulares

- Validar la extracción de teobromina y cafeína con microondas focalizadas a través de un diseño experimental
- Evaluar los parámetros críticos que afectan la extracción y separación de teobromina y cafeína en muestras de cacao.
- Comparar la extracción de teobromina y cafeína utilizando microondas focalizadas contra la extracción por agitación.
- Evaluar la concentración de teobromina y cafeína en diferentes muestras de cacao.

ANTECEDENTES

III.- ANTECEDENTES

III-1 CACAO

Theobroma cacao L., es el nombre científico que recibe el árbol del cacao o cacaotero. *Theobroma*, en griego, significa 'bebida de los dioses', es una especie nativa del sureste de México que se extiende desde Mesoamérica hasta las selvas del Amazonas, Venezuela, Ecuador, Brasil, Perú y cuencas del Orinoco en Sudamérica. El fruto maduro tiene un color de naranja a rojizo, mide de 15-20 cm de largo, y tiene un forma semejante a un calabacín puntiagudo (Figura 1) y contiene de 30 – 60 semillas metidas en una pulpa mucilaginosa ^[1].



Figura (1) Semillas de cacao antes de ser fermentadas y tostarse.

Tras fermentar en cajas, los granos separados se secan hasta que tengan un contenido de humedad entre el 6 y el 8%. El color y el sabor final de los granos dependen en gran medida del método de fermentación ^[1,2].

III- 1.1 Calidad intrínseca y física del grano de cacao.

Hay dos calidades que se reconoce en el mercado común del cacao, la física y la intrínseca:

1) La física: es la forma de las almendras, en general se presentan limpias y de coloraciones variadas, predominando el marrón. Suelen tener de un 6 - 8 % de humedad relativa.

2) La calidad intrínseca: es la inherente al sabor y aroma del cacao. Todo cacao tiene un sabor que está determinado genéticamente y que es bien definido, pero para que se desarrolle plenamente tiene que sufrir un proceso de transformaciones internas que se inician con la muerte del embrión debido a la penetración del ácido acético y la temperatura alta, las cuales se provocan con la fermentación alcohólica de la primera fase del curado o fermentación del cacao.

Esta es una de las fases que mayor control de calidad requiere dentro del proceso, debido a que si no sufre un beneficio adecuado pueden originar un cacao pobre en nutrientes. Cuando es la finalización de la fermentación (beneficio del cacao), se observa una disminución en la temperatura, y con un secado paulatino, cada variedad desarrolla su propio sabor ^[1,3].

III-1.2 Variedades del cacao.

Cualquier variedad de cacao que no recibe la fermentación y el secado adecuado no desarrolla su sabor típico, formándose lo que se llama cacao de bulto (“row cocoa”), siendo no aceptado por los consumidores. No existe una clasificación adecuada para los sabores de cacao, pero si existen diferencias muy claras por el origen. La clasificación más aceptada es la de cacaos finos, que generalmente se agrupan en los tipos genéticos denominados Criollos (grano de baja calidad), Forasteros u ordinarios, las mezclas de estos dos tipos de grano producen un cacao intermedio que se denomina Trinitario.

III-1.2.1 El cacao criollo

Llamado también “nativo”, es la variedad que representa a los cacaos originales, es un cacao reconocido como de gran calidad, y presenta un escaso contenido en taninos. Es bastante cotizado en el mercado por la finura y poderoso aroma que presenta, por lo que se le destina principalmente a la chocolatería fina. Se cultiva en México, Venezuela, Colombia, Nicaragua, Guatemala, Trinidad y Jamaica.

III-1.2.2 El cacao forastero

Es originario de la zona de la alta Amazonia. Es un cacao normal, más resistente y más productivo que el criollo, su cultivo representa el 80% de la producción mundial. Se caracteriza por tener una cáscara gruesa, ser poco aromático y bastante amargo y se destina a la fabricación de los chocolates de baja calidad.

III-1.2.3 El cacao trinitario

Es un híbrido procedente de la mezcla de los cacaos criollo y forastero, cuya calidad se inclina más al segundo. Su nombre se debe a que su hibridación y cultivo inicial se hizo en Trinidad (Antillas). Hereda la robustez del cacao forastero y el delicado sabor del cacao criollo, tiene un fuerte contenido de manteca de cacao y representa el 15% de la producción mundial ^[3].

III-1.3 Composición y producción mundial del grano de cacao.

La tabla 1, muestra la composición del grano de cacao, se puede observar que la teobromina es más abundante con respecto a la cafeína, (relación 6:1).

Compuesto	Cantidad (%)
Agua	5.0
Grasa	54
Cafeína	0.2
Teobromina	1.2
Polihidroxifenoles	6.0
Proteína bruta	11.5
Mono y oligosacáridos	1.0
Almidón	6.0
Pentosanos	1.5
Celulosa	9.0
Ácido carboxílico	1.5
Otras sustancias	0.5
Cenizas	1.6

Tabla (1) Composición general del grano de cacao ^[1].

En la tabla 2, se observa que México ocupa el 7º lugar en la producción mundial de cacao siendo que el grano mexicano es de gran calidad al igual que el de los primeros lugares que son Costa de Marfil y Ecuador.

Costa de Marfil	1330
Ghana	736
Nigeria Camerún	336
Brasil	166.5
Ecuador	213.8
Colombia	137.2
México	55.3
R. Dominicana	48.4
Malasia	610

Tabla (2). Producción mundial de cacao en granos (en millones de toneladas) F.A.O. 2005^[3]

III-1.4 Fermentación.

El proceso químico de fermentaciones comienza por la reproducción de las bacterias y levaduras presentes en la pulpa que rodea los granos. Los microorganismos producen la descomposición de la pulpa formando un líquido ácido, el cual produce un incremento en la temperatura, como consecuencia se produce un cambio de color del púrpura al marrón chocolate y el olor a cacao empieza a manifestarse, algunos de los precursores originados durante la fermentación son; aminoácidos y péptidos de cadena corta.

La teobromina se encuentra en los granos de cacao ligada muy débilmente a los taninos; se libera por el ácido acético formado durante la fermentación de los granos. Parte de esta teobromina pasa a la cáscara del grano.

Se obtienen dos consecuencias a través del proceso de fermentación: en la primera, el hecho de que la pulpa se convierta en ácido acético que se evapora y hace que la semilla se hinche hasta parecerse a una almendra gruesa de color marrón (Figura 2), la segunda consecuencia es la reducción del sabor amargo y astringente, y el desarrollo los precursores del aroma por la oxidación enzimática de los polifenoles ^[4,5].

La calidad de los granos depende de este proceso de fermentación, si es excesivo, el cacao puede arruinarse; si es insuficiente, puede adquirir un sabor desagradable y ser atacado por los hongos.



Figura (2) Grano de cacao fermentado y tostado con y sin cáscara

Después de la fermentación, sigue el paso de secado. Los granos se extienden (Figura 3), mientras se rastrillan constantemente, se desecan. En las grandes plantaciones, esto se hace con enormes bandejas, tanto en el exterior para que actúen los rayos del sol, como en cobertizos mediante calor artificial. El peso de los granos disminuye con este proceso, llegando a una cuarta parte de su peso original ^[6].

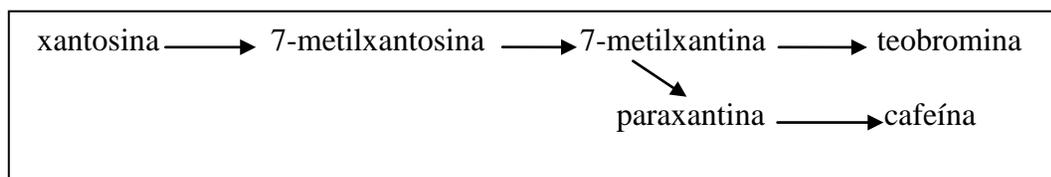


Figura (3) Desecación de los granos de cacao al sol

III-2 CARACTERISTICAS DE LA TEOBROMINA Y LA CAFEÍNA

Tanto la teobromina como la cafeína son cristales que al observarse en el microscopio tienen forma de agujas. Presentan buena solubilidad en agua siendo el etanol el mejor disolvente. A diferencia de la teobromina la cafeína es soluble en cloroformo [7].

La formación de teobromina y cafeína en el cacao es a partir de las purinas, las cuales sufren procesos de metilación, la ruta se muestra a continuación [6,8].



Los dos compuestos son muy parecidos estructuralmente, ambos pertenecen al grupo de las metilxantinas y están presentes en proporciones diferentes en el cacao. La diferencia en la estructuras de estas metilxantinas es que la teobromina tiene dos grupos metilo en las posiciones 3 y 7, mientras que la cafeína tiene 3 metilos en las posiciones 1,3,7; por lo tanto la teobromina es más fácil de ionizar y esta propiedad se aprovecha para su separación líquido-líquido en donde la cafeína se queda en la fase orgánica, mientras la teobromina en la acuosa. El hecho de que la teobromina carezca de un grupo metilo con respecto a la cafeína y los pKa's de cada molécula, hace que a un intervalo de pH (12.0-12.5) la teobromina presente una ionización que la cafeína no [7,9] (ver diagrama 1).



Estructura de las moléculas de estudio ^[10].

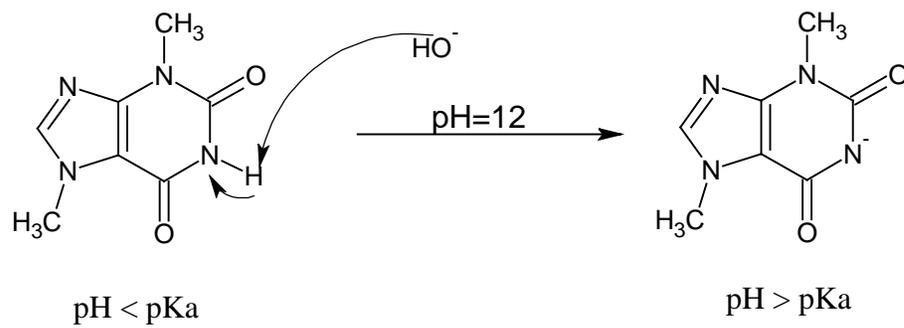


Diagrama (1) Ionización de la teobromina a un intervalo de pH de 12.0-12.5

III-3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se han desarrollado muchos métodos para la cuantificación de teobromina y cafeína destacando la cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas (LC-MS/MS), permitiendo su análisis en fluidos biológicos (saliva, plasma y orina) [11].

La determinación de teobromina y cafeína en suplementos alimenticios ha causado un gran interés debido a su gran consumo en la dieta y el efecto que estas metilxantinas pueden producir en combinación con otro tipo de sustancias (alcohol), debido a su gran impacto sobre el sistema nervioso central. La cuantificación de estos analitos en los suplementos alimenticios se ha realizado por UPLC (ultra-performance liquid chromatography) [12].

Las técnicas electroquímicas (voltamperometría, potenciometría y amperometría), son muy accesibles y sensibles para la determinación de las metilxantinas, reportando porcentajes de recuperación del método de análisis 95-105 % [13-15].

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es la técnica analítica más utilizada para la separación y cuantificación de las metilxantinas debido a su alta resolución, presentando como ventaja principal que se pueden analizar muestras complejas [16].

III-4 Extracción sólido-líquido

Con la extracción sólido-líquido se pueden extraer componentes solubles de sólidos con ayuda de un disolvente. Los campos de aplicación de esta extracción son por ejemplo: la obtención de aceite de frutos oleaginosos o la lixiviación de minerales. En la práctica, al término de la extracción, la matriz siempre contendrá todavía una parte del analito además, una parte del disolvente permanecerá también ligada en forma de adsorbato a ésta.

El éxito de la extracción depende en gran medida del tratamiento anterior que se le pueda dar al sólido. En algunos casos, las pequeñas partículas del material soluble están completamente rodeadas de una matriz de materia insoluble. En dicho caso, el disolvente entra en contacto con el material soluble por difusión.

La velocidad de extracción está afectada por los siguientes factores:

- ✓ Temperatura
- ✓ Concentración del disolvente
- ✓ Tamaño de las partículas
- ✓ Porosidad
- ✓ Agitación

Al aumentar la temperatura se aumenta la eficiencia de extracción porque la solubilidad es mayor. La temperatura máxima para cada sistema está limitada por el punto de ebullición del disolvente, el punto de degradación del producto, solubilidad de impurezas y por razones energéticas.

La reducción del tamaño de partículas tiene gran importancia porque aumenta el área superficial y disminuye el tiempo necesario para la extracción, sobre todo para sólidos de baja porosidad. La porosidad permite que el líquido penetre a través de los canales formados por los poros dentro del sólido, aumentando así el área activa para la extracción.

La agitación da una mayor eficiencia en la extracción debido a que disminuye la película del fluido que cubre la superficie del sólido en reposo y que actúa como una resistencia a la difusión [17,18].

III-4.1 EXTRACCION ASISTIDA CON MICROONDAS FOCALIZADAS

Las extracciones asistidas por microondas han atraído el interés de muchos investigadores debido a que se pueden realizar extracciones rápidas y con eficiencias comparables con los métodos convencionales (soxhlet, agitación).

La extracción asistida con microondas es un proceso donde se emplea energía en forma de microondas, las cuales son generadas por un magnetrón, para extraer los analitos de interés de una matriz por el mecanismo del contacto directo con el calentamiento de disolventes.

Una de las principales ventajas de usar este proceso es la reducción del tiempo de extracción. En el calentamiento convencional en un periodo finito de tiempo, es necesario calentar los contenedores antes de que el calor sea transferido a la disolución, mientras que usando

microondas, la disolución es directamente calentada, esto mantiene el gradiente de temperatura a un mínimo y acelera la velocidad de calentamiento ^[19,20].

Los principales parámetros en la operación son: potencia del magnetrón, elección del disolvente, volumen del disolvente, temperatura, tiempo de irradiación y características de la matriz ^[19]. Las microondas son un tipo de radiación que se sitúan en la región de transición entre la radiación infrarroja y la de radiofrecuencia, a frecuencias entre 300 GHz y 300 MHz (1 Hz = 10⁶ MHz, 10⁹ GHz) (Figura 4).

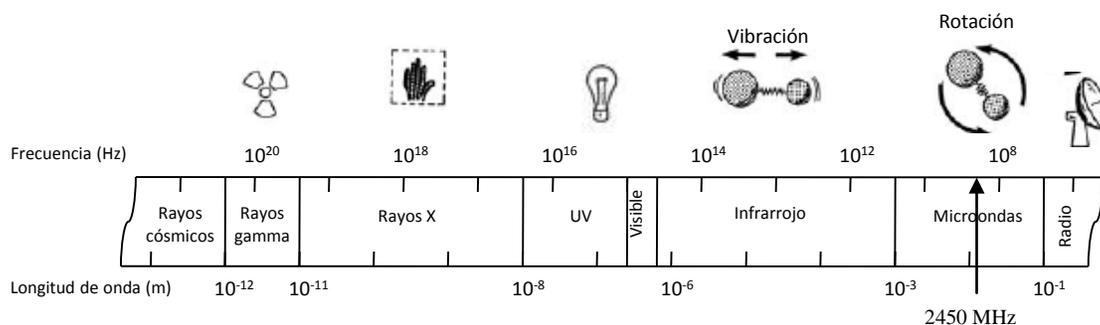


Figura (4) Espectro electromagnético ^[19].

El principio del calentamiento usando energía microondas está basado en el efecto directo de las microondas sobre las moléculas por conducción iónica y rotación dipolar. En muchas aplicaciones estos dos mecanismos toman lugar simultáneamente: (a) la conducción iónica es la migración electroforética de los iones cuando un campo electromagnético es aplicado, por lo que la resistencia de la solución a este flujo de iones produce fricción y así el calentamiento de la solución; (b) la rotación bipolar sucede por el alineamiento de los dipolos por la aplicación del campo, en donde la frecuencia de 2450 MHz usada en los sistemas comerciales induce al alineamiento de dipolos y movimientos al azar de 4.9×10^9 veces por segundo que ocasionan desplazamientos moleculares y en consecuencia un calentamiento muy rápido ^[19-21].

De este modo la habilidad de un disolvente para absorber energía microondas y transferirla en forma de calor a otras moléculas parcialmente dependerá del factor de disipación ($\tan \delta$), dado por la siguiente ecuación:

$$(\tan \delta) = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

Donde ϵ'' es la pérdida dieléctrica (una medida de la eficiencia de conversión de energía de microondas en calor) y ϵ' es la constante dieléctrica (una medida de la polarizabilidad de una molécula en un campo eléctrico).

Las moléculas polares y soluciones iónicas absorben energía microondas fuertemente porque tienen un momento bipolar permanente que es afectado por las microondas.

Los disolventes no polares no son calentados cuando se exponen a las microondas. Un estimado de la habilidad de las microondas es hacer rotar las moléculas y puede ser deducido a partir de los valores de la constante dieléctrica, ϵ' (Tabla 3) ^[19,22].

Los disolventes polares como el agua, y el metanol, fácilmente absorben la energía microondas y por eso son calentados cuando son sometidos a esta irradiación, mientras que los disolventes no polares como; hexano y tolueno, no se calientan.

Cuando el proceso de extracción se lleva a cabo generalmente en recipientes cerrados, el disolvente elegido puede ser calentado por arriba de su punto de ebullición normal, lo cual reduce el tiempo requerido para el proceso de extracción.

Disolvente	ϵ'	Momento dipolar	$\tan \delta$ ($\times 10^4$)	p. eb. °C
Hexano	1.89			68.7
Etanol	24.30	1.96	2500	78.0
Metanol	32.63	2.87	6400	64.7
2-Propanol	19.90	1.66	6700	82.0
Agua	78.30	2.30	1570	100
Acetonitrilo	37.50			81.6
Acetona-hexano (1:1 v/v)				52.0

Tabla (3) Propiedades de los disolventes para extracción asistida con microondas ^[21].

En la práctica se dispone de dos tipos de sistemas de calentamiento por microondas, distinguidos por las siguientes características:

- Sistema abierto: el calentamiento de esta modalidad ocurre a presión atmosférica y la irradiación de microondas es focalizada. Posee solo un recipiente de extracción de

borosilicato o cuarzo, con capacidad máxima de 10 g de muestra, el cual opera con incrementos de potencia de 30 w con una potencia máxima de 300 w; se requiere la adaptación de un sistema de refrigeración para evitar la pérdida del disolvente (figura 5). la aplicación de este tipo de sistema es la extracción en matrices de carácter alimentario, clínico y ambiental [22-24].



Figura (5). Equipo de Microondas Focalizadas

- Sistema cerrado: la operación ocurre bajo condiciones presurizadas (200 psi máx.), donde se monitorea la irradiación con opción de programarse en incrementos de 1% hasta el 100 % (950 w) en energía, así como la temperatura seleccionada que va desde 20 °C hasta 200 °C. Además 12 recipientes de extracción con capacidad de 100 mL pueden ser irradiados simultáneamente, posicionados en un carrusel con giros de 180°. Estos aparatos tienen características para detectar fugas de disolventes y evitar accidentes (Figura 6).

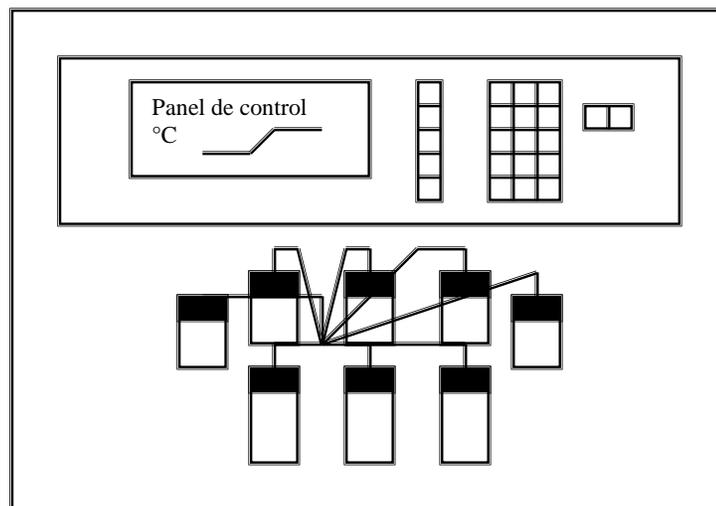


Figura (6) Diagrama esquemático de un sistema de microondas cerrado

Las modalidades de este método se han colocado como una alternativa atractiva a las técnicas convencionales, ya que su campo de aplicación al igual que el de sistema abierto esta sobre matrices de carácter clínico, alimenticio y ambiental ^[23,24]. En este trabajo se desarrolló un método de extracción de TB y CF asistido por microondas focalizadas y se compararon los resultados obtenidos con respecto a los métodos convencionales de extracción.

METODOLOGÍA

IV- METODOLOGÍA

IV-1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Para la extracción de teobromina y cafeína se utilizaron los siguientes reactivos y disoluciones:

- Bicarbonato de Sodio **J.T. Baker**
- Éter de petróleo **J.T. Baker**
- Cloroformo **Mallinckrodt**

Disolución de Carrez I: se pesó aproximadamente 24 g de acetato de zinc (Baker), se disolvió con 50 mL de agua destilada y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 3 mL de ácido acético (Baker) y se llevó al aforo con agua destilada.

Disolución de Carrez II: se pesó aproximadamente 15 g de ferrocianuro de potasio (Sigma) y se disolvió en 50 mL de agua destilada, se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

Disolución de HCl al 10%: se transfirieron 10 mL de ácido clorhídrico (Baker) a un matraz volumétrico de 100 mL que contenía 50 mL de agua destilada y se llevó al aforo con agua destilada.

Disolución de acetato de plomo anhidro: se pesaron aproximadamente 15 g de acetato de plomo anhidro (Baker) y se adicionaron 150 mL de agua destilada en un matraz erlenmeyer de 250 mL, se calentó la disolución con agitación hasta que estuvo clara, se enfrió y se filtró, se ajustó la densidad de la disolución entre 1.22-1.23 mg/mL con agua destilada.

Disolución de NaOH 0,1M: se pesaron aproximadamente 4 g de hidróxido de sodio (Baker) y se disolvieron con 50 mL de agua, se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a la marca con agua destilada.

Para la cuantificación de teobromina y cafeína se prepararon las siguientes disoluciones:

Disolución madre de Teobromina: se pesaron aproximadamente 500 mg de Teobromina (Fluka) con un grado de pureza del 98 % y se llevó a 100 mL con agua destilada en un matraz volumétrico. De esta disolución madre se prepararon 7 estándares entre 3 µg/mL y 30 µg/mL.

Disolución madre de Cafeína: se pesaron aproximadamente 500 mg de Cafeína (Sigma) con un grado de pureza mayor al 99% y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 100 mL con cloroformo. De esta disolución madre se prepararon 7 estándares entre 3 µg/mL y 30 µg/mL

IV-2 EQUIPO

- Microondas Focalizadas **PROLABO[®] Maxidigest Modelo MX350**
- Potenciómetro **OAKTON[®] pH 500 Series Modelo 00702-75**
- Baño de ultrasonido **BRANSON[®] Modelo 2510R**
- Parrilla **CIMAREC[®] Modelo sp46925**
- Espectrofotómetro **VARIAN[®] Cary 3 UV**
- Centrifuga **HETTICH[®] Modelo EBA20**
- Horno de secado **RIOS ROCHA[®] Modelo E41**
- Balanza analítica **OHAUS[®] Modelo E12140**

IV-3 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras de grano de cacao utilizadas fueron de Comalcalco, Tabasco. También se determino TB y CF en la cáscara del grano y en cocoa en polvo comercial. Para todas las pruebas, el grano se descascarilló y se molió en un mortero hasta obtener un polvo fino. Las determinaciones se hicieron en grano desengrasado y sin desengrasar. Para desengrasar el grano se utilizaron 3 extracciones de 5 mL de éter de petróleo. Posteriormente se separó la parte insoluble (cocoa) centrifugando a 2500 rpm durante 2 min., el éter de petróleo se evaporó y para cuantificar el porcentaje de grasa se pesó el grano antes de desengrasar y después del tratamiento.

- ✓ Se realizó la prueba de contenido de humedad, de acuerdo al NMX-F-268-1976, se pesaron 5 gramos de grano de cacao molido y posteriormente se colocó en un horno de secado a una temperatura de $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 16 hr.

- ✓ También la cáscara de grano de cacao se molió en un mortero y se cuantificó el contenido de teobromina y cafeína.

Para calcular el contenido de humedad se utilizó el siguiente algoritmo:

$$\text{Contenido de humedad} = [M-D] / [M-T]*100$$

Donde:

M= masa de la muestra original con el vaso

D= masa de la muestra seca con el vaso

T= masa del vaso seco

IV-4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En este trabajo se desarrollo un método para la extracción de teobromina y cafeína utilizando microondas focalizadas a presión atmosférica, el método propuesto por microondas se comparó contra un método de extracción sólido-líquido con agitación^[9,25], el cual también se optimizó a partir de metodologías ya estudiadas.

A continuación se describe cada una de las metodologías que se utilizaron para poder optimizar tanto la metodología por agitación magnética como la metodología con microondas focalizadas.

IV-4.1 Método de extracción por agitación. (MI)^[9]: a 1g de muestra de grano de cacao descascarillado y molido, se le adicionaron 96 mL de agua destilada en un matraz erlenmeyer de 150 mL, se registró el peso total de la mezcla. La mezcla se calentó a $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ manteniéndose dicha temperatura por 5 minutos con agitación constante.

Posteriormente se adicionaron 4 mL de acetato de plomo registrándose el peso, la mezcla se dejó enfriar y se pesó. Se compensó el peso perdido con agua destilada. Se filtró la disolución descartando los primeros mililitros. Por cada 10 mL obtenidos del filtrado se adicionó 0.1g de NaHCO_3 , nuevamente se filtró la disolución descartando los primeros mililitros hasta que la disolución se mostró clara. Se transfirieron 50 mL del filtrado a un matraz erlenmeyer de 100 mL y se le adicionaron 5.5 mL de NaOH 1 M, se ajustó el pH entre 12.5-12.7.

La disolución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo la cafeína con cloroformo en porciones de 15 mL, 15 mL y 10 mL; la fase orgánica se recolectó en un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó al aforo (esta fase contiene a la cafeína). Se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 275.9 nm.

La fase acuosa, que contiene a la teobromina, se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada; se filtró la disolución descartando los primeros mililitros y se tomó una alícuota de 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL que contenía 0.55 mL de HCl al 10%, se aforó con agua destilada y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 272.7 nm.

IV-4.2 Método de extracción por reflujo (MII)^[25]: se pesó aproximadamente 1g de muestra de grano de cacao descascarillado este se transfirió a un matraz de bola de 250 mL al cual se le adicionaron 70 mL de agua destilada caliente, se colocó en reflujo con agitación durante una hora a una temperatura aproximada de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La mezcla se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se le adicionaron 5 mL del reactivo de Carrez I, y se agitó. Posteriormente, se agregaron 10 mL del reactivo de Carrez II, se aforó la mezcla con agua destilada y se filtró. Se transfirieron 50 mL del filtrado a un matraz erlenmeyer de 100 mL y se le adicionaron 5.5 mL de NaOH 1 M, se ajustó el pH entre 12.5-12.7. El tratamiento de separación líquido-líquido de los analitos se realizó de la misma forma que la metodología I.

NOTA: Para las metodologías siguientes la separación líquido-líquido de los analitos se realizó de la misma forma que la metodología I pero el ajuste de las alícuotas se redujeron para cafeína a 25 mL de cloroformo y para teobromina se tomó una alícuota de 1 mL directo de la fase acuosa y se aforo a 25 mL.

IV-4.3 Método de extracción por agitación propuesto (MIII): se pesó aproximadamente 1g de muestra de grano de cacao descascarillado. La muestra se colocó en un matraz erlenmeyer de 150 mL el cual contenía 70 mL de agua destilada a una temperatura de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; la mezcla se mantuvo durante 5 min. con agitación constante. Se adicionaron 5 mL de reactivo de Carrez I, la mezcla se dejó enfriar y se adicionó NaHCO_3 hasta la formación de un precipitado. La mezcla se filtró y el filtrado se depositó en un matraz volumétrico de 100 mL el cual se llevó al aforo con agua destilada. Se transfirieron 50 mL de la disolución anterior a un matraz erlenmeyer y se ajustó el pH entre 12.5-12.7 con NaOH 1 M.

IV-4.4 Método de extracción por microondas focalizadas (EAMF): se pesó 0.5 g de muestra (grano de cacao descascarillado y molido, cocoa en polvo y cáscara de grano), y se transfirió a un tubo colector de microondas adicionándole 90 mL de agua destilada y 5 mL de reactivo de Carrez I.

Se establecieron las condiciones del equipo: (potencia 210 W, tiempo de irradiación 5 min. y volumen del extractante 95 mL). Después de la extracción se enfrió la disolución y se adicionó NaHCO_3 hasta que se formó un precipitado. Se filtró la disolución a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua destilada, se transfirieron 50 mL del filtrado a un matraz erlenmeyer y se le adicionó a la disolución 5.5 mL de NaOH 1 M para ajustar el pH entre 12.5-12.7.

En la tabla (4), se describe un resumen de las metodologías descritas con anterioridad.

	CONDICIONES DE TRABAJO	REACTIVOS EMPLEADOS
MI	Extracción con agitación en parrilla de calentamiento durante 5 minutos (temperatura 80°C).	Acetato de plomo Bicarbonato de sodio
MII	Reflujo durante 1 hora, (temperatura 80°C)	Reactivo de Carrez I (acetato de zinc 24%) Reactivo de Carrez II (ferrocianuro de potasio)
MIII	Extracción con agitación en parrilla de calentamiento durante 5 minutos (temperatura 80°C)	Reactivo de Carrez I Bicarbonato de sodio
EAMF	Extracción asistida con microondas focalizadas. 5 minutos de extracción Temperatura 80°C Potencia 210 W	Reactivo de Carrez I Bicarbonato de sodio

Tabla (4). Metodologías de estudio.

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V-1 Selección del método de detección.

Existen muchas técnicas para la cuantificación de teobromina y cafeína como son: cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), técnicas electroquímicas (voltamperometría, potenciometría) y espectrofotometría UV-Visible. El método de detección seleccionado en este trabajo (espectrofotometría) es sencillo y rápido de llevar a cabo, además de que produce resultados confiables y reproducibles.

V-1.1 Determinación de la longitud de onda máxima de absorción para teobromina y cafeína.

Para determinar la longitud de onda máxima de absorción de la teobromina y de la cafeína se hizo un barrido a diferentes longitudes de onda de una disolución estándar y el intervalo seleccionado fue de 190 nm a 350 nm.

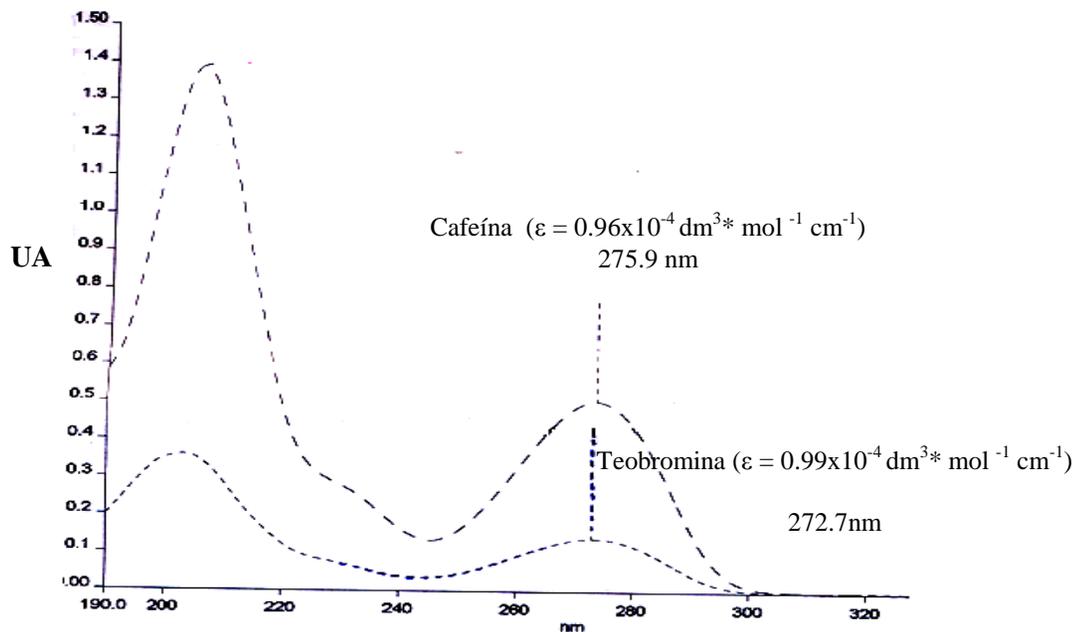


Figura (7). Espectros de absorción de los estándares de teobromina y cafeína.

La figura 7, muestra los espectros de absorción de ambos analitos confirmando que de 272.7 nm y 275.9 nm, son las longitudes de onda a las que la TB y la CF presentan la mayor absorbancia, otra observación es que los espectros se solapan, lo cual demuestra la interferencia de cafeína al medir la teobromina en las muestras de cacao.

V-1.2 Elaboración de las curvas de calibración.

En la tabla 5, se presentan las concentraciones de las disoluciones estándar utilizadas para determinar el intervalo lineal para cada curva de calibración.

Concentraciones en soluciones µg/mL							
Teobromina	3.09	5.16	10.32	15.48	20.64	25.8	30.96
Cafeína	3.18	5.23	10.46	15.69	20.92	26.15	31.38

Tabla (5) Concentraciones utilizadas para la determinación de las curvas de calibración

En las figuras 8 y 9, se muestran las representaciones gráficas y las respectivas ecuaciones de la recta de las curvas para TB y CF. La r^2 es mayor al 0.999, lo que indica una buena linealidad. En la tabla 6, se muestran los errores en la pendiente y en la ordenada al origen al igual que su límite de detección (LD) (anexo I) [25].

Compuesto	Límite de detección (LD)	Pendiente*	Ordenada al origen *
Teobromina	0.1136	0.055 ± 0.0020	0.011 ± 0.0365
Cafeína	0.0990	0.036 ± 0.0017	-0.008 ± 0.031

Tabla (6) Errores en la pendiente y ordenada al origen. Límite de detección.

*Nivel de confianza de 95%

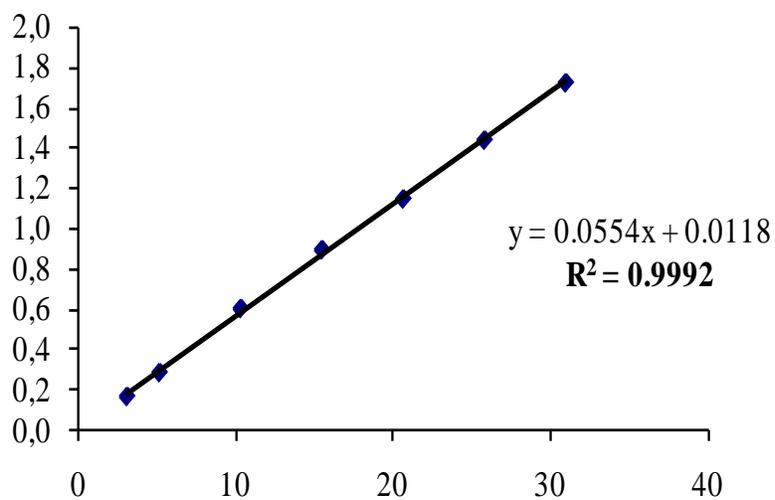


Figura (8) Curva de calibración instrumental de teobromina

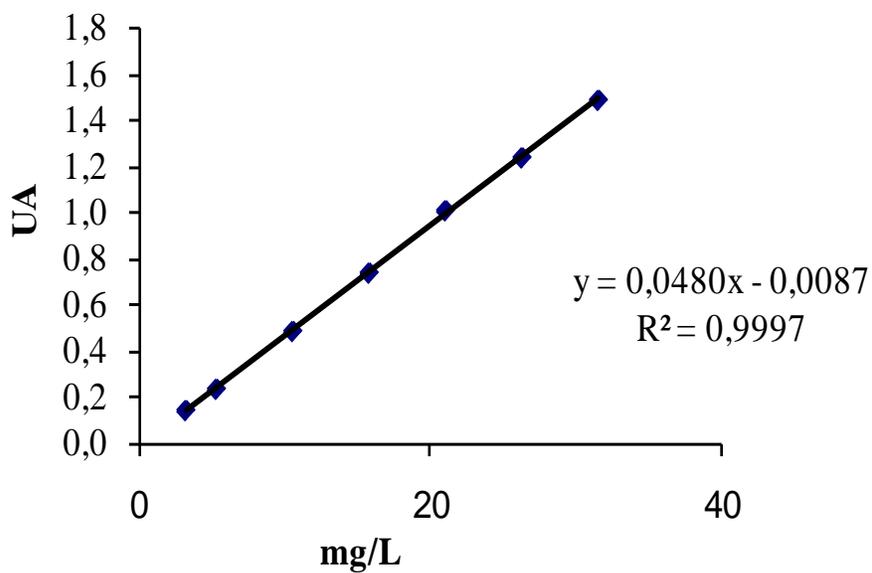


Figura (9) Curva de calibración instrumental de cafeína

V-2 PARAMETROS DE EVALUACIÓN DEL BENEFICIO DEL GRANO DE CACAO

Se evaluó el contenido de humedad en el grano de cacao de acuerdo al procedimiento de la NMX-F-268-1976.

Otros parámetros que se pueden evaluar en los granos de cacao es el tamaño de la almendra, sabor y pH, que vendrían siendo un conjunto de propiedades físico-químicas del grano.

La tabla 7, muestra los valores de referencia que están establecidos en la Gaceta Oficial N° 35928.

PARAMETROS	BAJO	NORMAL	ALTO
TAMAÑO DEL GRANO (g)	< 1.05	1.06 a 1.2	> 1.3
PORCENTAJE DE HUMEDAD	6 a 6.5	7 a 8	> 8.0
PORCENTAJE DE GRASA	< 52	52 a 55	> 55
pH	< 5.0	5.1 a 5.5	> 5.5
SABOR	Amargo	Ácido	Normal

Tabla (7). Valores de referencia para las pruebas físico-químicas del grano de cacao Gaceta Oficial N° 35928.

Siendo el nivel bajo el de mejor calidad; el normal calidad media y el alto de baja calidad

V-2.1 Determinación del contenido de humedad, grasa, tamaño y pH.

Se realizó por triplicado la determinación del contenido de humedad en las muestras de grano de cacao, se contó con muestras del mismo origen de cultivo que fue el estado de Tabasco, pero se compraron en diferentes lugares, para lo cual cada grano sufrió un diferente beneficio.

El grano de análisis (se llamará A) con el que se realizó el trabajo de investigación fue comprado en el D.F. y contaba con el beneficio de secado al sol y posteriormente secado en un horno. Los otros granos se compraron en el estado de Oaxaca, uno de ellos sufrió el mismo beneficio

que el grano A (se llamará grano B) y el otro sólo tuvo el beneficio de secado al sol (se llamará grano C).

Aunque a los granos de cacao no se les realizan todas las pruebas (por ejemplo: cenizas totales, carbohidratos, proteína cruda, etc. de acuerdo a lo establecido en las Normas COVENIN de FONDONORMA), para establecer si el grano es de alta o baja calidad, estas pruebas nos dan una idea de cuál de los granos sufrió un beneficio adecuado y por lo tanto refleja un mayor contenido de los analitos.

Como se observa en la tabla 8, los granos que menor porcentaje de humedad presentaron fueron el A y B ya que estos fueron sometidos a un doble proceso de secado (al sol y posterior en horno). Aún así todos los granos cumplen con los requisitos de calidad, ya que un grano con una humedad mayor al 8% puede presentar formación de hongos.

La grasa contenida en el grano molido se eliminó con éter de petróleo, desechando el sobrenadante. El exceso de éter de petróleo en el grano desengrasado se evaporó con un flujo de nitrógeno, y posteriormente se pesó, por la diferencia de pesos se calculó el porcentaje de grasa contenido en las muestras. El pH del grano se determinó con una disolución de grano de cacao molido mezclado en agua desionizada. Para la prueba, (tamaño), midiendo la almendra con un vernier (ver tabla 8).

MUESTRAS	% DE		% DE GRASA	pH
	HUMEDAD	TAMAÑO		
GRANO A	2.52	1.0	24 %	4.5
	2.51			
	2.45			
GRANO B	2.24	0.98	21 %	4.2
	2.29			
	2.31			
GRANO C	4.46	1.3	27 %	4.8
	4.40			
	4.08			

Tabla (8). Pruebas físico-químicas realizadas a los granos de cacao.

V-3 EVALUACION DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN POR AGITACIÓN

Las metodologías MI (acetato de plomo y bicarbonato de sodio) y MII (Reactivos de Carrez I y II) se realizaron de acuerdo en lo establecido en la bibliografía reportada [9,25] y los resultados se compararon con los obtenidos por una tercera metodología (MIII), que es el resultado de la combinación de MI y MII, para lo cual fue necesario realizar un estudio de optimización.

Para MIII se utilizó una combinación de reactivos tomados de las metodologías I y II, que presentaran el mismo efecto y tuvieran un menor impacto sobre el medio ambiente, también se redujeron las cantidades utilizadas de solventes con la finalidad de generar la menor cantidad posible de residuos. Se sustituyó el acetato de plomo por acetato de zinc y el Reactivo de Carrez II (ferrocianuro de potasio) por bicarbonato de sodio. De esta forma con la metodología propuesta (MIII), se utilizan reactivos menos tóxicos y más económicos y hay un mejor manejo para el tratamiento de residuos. El acetato de plomo y el reactivo Carrez I (acetato de zinc), se utilizaron para precipitar moléculas de alto peso molecular contenidas en la muestra, como: proteínas y taninos. La función del bicarbonato de sodio y del Reactivo de Carrez II es remover los iones metálicos Zn^{2+} y Pb^{2+} , provenientes de los primeros reactivos adicionados a las muestras.

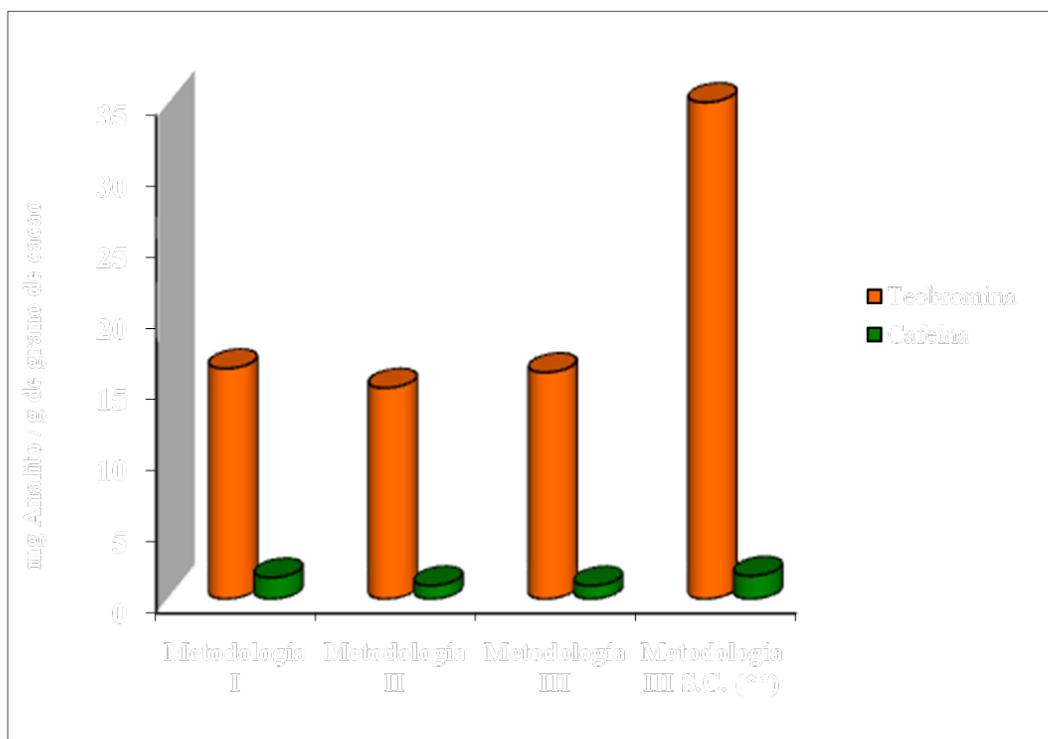


Figura (10). Concentración de TB y CF en el grano de cacao para comparar entre las metodologías realizadas; **s/c es la metodología III sin adición del Reactivo de Carrez I

En la figura 10, se muestran las concentraciones obtenidas de teobromina y cafeína en las muestras de cacao (sin desengrasar) para cada metodología. También se observa que cuando no se adicionan los reactivos para precipitar los taninos y las proteínas de alto peso molecular, hay un incremento en la concentración obtenida de teobromina y cafeína, con lo cual se concluye la importancia de la adición de los reactivos de Carrez I y bicarbonato de sodio.

Para separar la teobromina y la cafeína del extracto se ajustó el pH en un rango 12.5-12.7, esto es primordial ya que se necesita tener a uno de los dos analitos en su forma molecular para que se vea favorecida la extracción (ver en la tabla 9), debido a que la teobromina es mas soluble en agua con respecto a la cafeína, entonces entre más iónica se encuentre la molécula más se retendrá en la fase acuosa y la cafeína pasará a la fase orgánica.

pH final en H ₂ O	Teobromina en 50 mL de H ₂ O		
	mg	% recuperación	Kd= C _{CHCl₃} /C _{H₂O}
11.1	3.829	95.3	0.0140
11.8	3.957	98.93	0.0130
12.3	3.986	99.65	0.0026
12.5	3.978	99.46	0.0020
12.7	4.028	100.70	0.005
13.1	4.019	100.40	0.005

Tabla (9). Distribución de teobromina entre agua y cloroformo en función del pH ^[9].

V-3.1 Análisis estadístico entre los métodos

Se comparó la metodología III que se propone en este trabajo de investigación con las metodologías I y II realizando una prueba de *F* y el contraste de *t* para cada analito. La tabla 10, muestra los promedios de las determinaciones realizadas para cada metodología.

Método	Teobromina			Cafeína		
MI	16.43	16.01	16.10	1.36	1.33	1.38
MII	15.04	14.61	14.71	0.833	0.802	0.833
MIII	17.45	18.51	17.67	0.895	0.907	0.887

Tabla (10). Concentración de teobromina y cafeína utilizando las metodologías I,II y III .

V-3.2 Prueba de F

El contraste de F considera la razón de las dos varianzas muestrales, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar, (S_1^2/S_2^2) [26-28]. A continuación se plantea la hipótesis nula (Ho) para esta prueba estadística.

Ho: Las varianzas de las metodologías I y II son iguales con respecto a la metodología III.

	M I		M II		M III	
	Teobromina	Cafeína	Teobromina	Cafeína	Teobromina	Cafeína
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Grados de libertad	2	2	2	2		
F	6.28	4.45	6.20	2.96		
Valor crítico F (dos colas)	39	39	39	39		
Varianza	0.0499	0.0004	0.0505	0.0003	0.3138	0.8960

Tabla (11). Prueba F para MI y MII contra MIII; con un porcentaje de error = $\alpha 0.05$.

En la tabla 11 se puede observar que *F* calculada para todos los casos de comparación es menor con respecto al valor crítico, por lo que Ho se acepta y no hay diferencia significativa entre las varianzas. Por lo tanto los métodos de comparación (MI, MII y MIII) cuentan con una precisión similar.

V-3.3 Prueba de t student

Esta prueba sirve para comparar dos métodos de análisis y ver si difieren los resultados obtenidos por ambos métodos, debido a que las diferencias entre las medias pueden estar en función de errores aleatorios y no son adjudicables precisamente a la metodología [25,28-29].

Ho: La metodología III presentará la misma media que la de las metodologías I y II.

	M I vs M III		M II vs M III		MIII	
	Teobromina	Cafeína	Teobromina	Cafeína	Teobromina	Cafeína
Media	16.184	0.896	14.789	0.823	17.879	1.365
Observaciones	3	3	3	3		
Grados de libertad	2	2	2	2		
Estadístico t	4.86	33.39	8.86	6.20		
Valor crítico t (dos colas)	4.43	4.43	4.43	4.43		

Tabla (12). Contraste t con varianzas iguales

La tabla 12, presenta los valores calculados de las medias de cada una de las metodologías, al igual que el estadístico t para su comparación con el valor crítico.

La prueba de t mostró que Ho se rechaza, por lo que MIII presenta una media diferente con respecto a las MI y MII.

La MI presenta una disminución de la cantidad extraída de teobromina y cafeína en comparación con MIII (ver valor de la media en la tabla 12), y esto se debe a que MI presenta un mayor error ya que el tratamiento de la muestra presenta varios pasos.

Por otra parte al comparar las medias de TB y CF de la muestra II con respecto a las otras, se observa una disminución en las concentraciones, debido a que se requiere de un paso de reflujo durante una hora lo que implica mayor error (ver tabla 12).

V- 4 Precisión de MIII

Una vez que se estableció la metodología por agitación, fue necesario calcular la precisión de ésta. Se realizó en las tres muestras de estudio (cocoa en polvo, grano de cacao y cáscara de grano de cacao).

V- 4.1 Precisión: se refiere a la dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud. Cuanto menor es la dispersión mayor la precisión. Una medida común de la variabilidad es la **desviación estándar relativa** de las mediciones y la precisión se puede estimar como una función de ella ^[24,26]. Se realizó por triplicado con pesadas independientes calculándose la desviación estándar relativa (DER) para cada caso.

La tabla 13, muestra las DER obtenidas para los analitos. Puede observarse en casi todos los casos que la DER es menor al 5%, la cual se ubica por debajo de los límites aceptables, que pueden llegar a ser del 10% cuando se trabaja a concentraciones del orden de mg/g ^[25].

PRECISIÓN		
Muestras	TB	CF
Grano de cacao	3.13%	1.14 %
Cocoa en polvo	3.73%	0.143 %
Cáscara de grano de cacao	0.613%	2.81%

Tabla (13). Desviación estándar relativa obtenida para cada analito.

V-5 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Con el objetivo de comparar que por los métodos por agitación y reflujo no existía una pérdida en la extracción de los analitos, se realizó el porcentaje de recobro con estándares de CF y TB.

V-5.1 Porcentaje de recobro: los recobros de los métodos se determinaron a través de una disolución estándar de cafeína y teobromina sin considerar la muestra. Una concentración conocida de estos analitos fue tratada por triplicado con cada uno de las metodologías, la relación de la cantidad adicionada contra la recuperada corresponde a las pérdidas obtenidas en las etapas de tratamiento de las muestras; los valores se muestran en la figura 11. Las metodologías I y III muestran recobros superiores a 98%; mientras que la metodología II presentó recobros entre 65-70 %, indicando que la etapa crítica en la pérdida de los analitos es el reflujo.

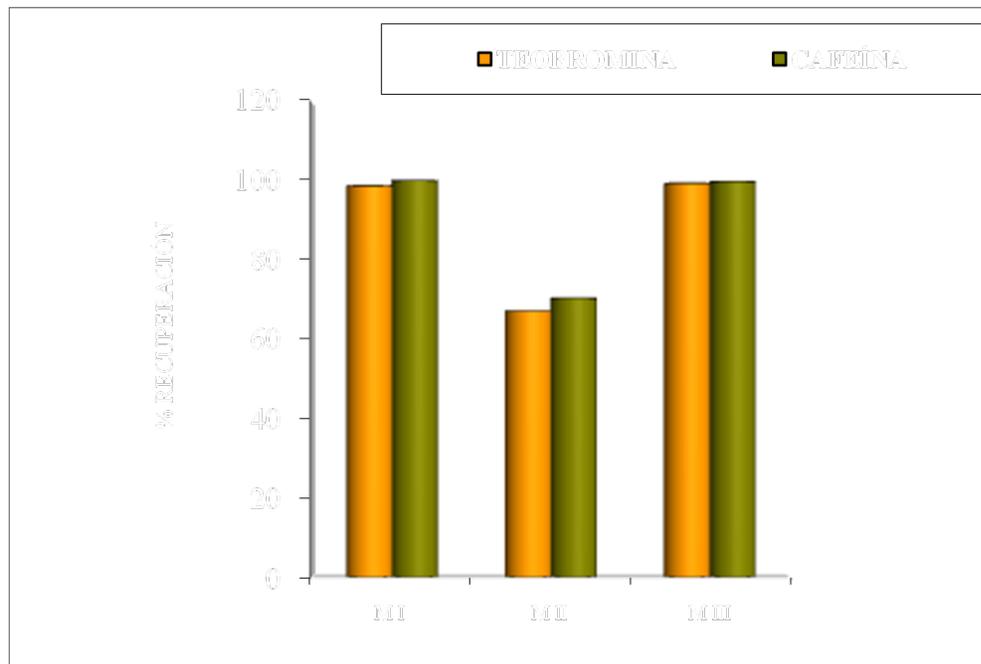


Figura (11). Representación del porcentaje de recuperación de TB y CF.

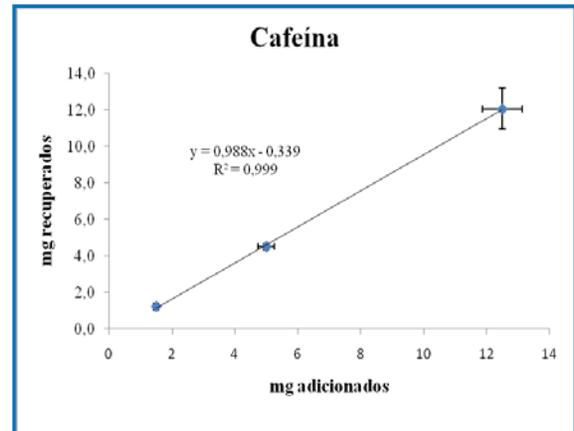
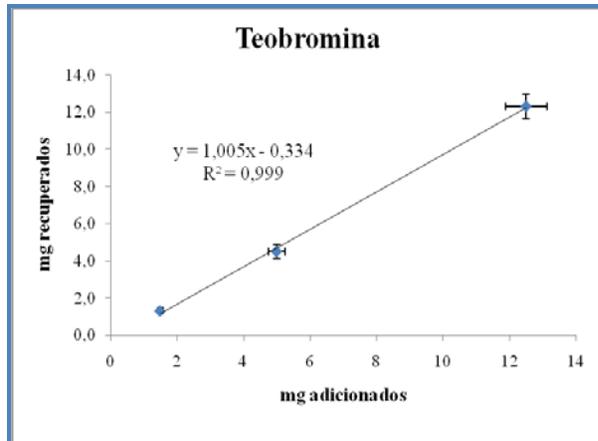
Se observó que a tiempos prolongados hay una pérdida en el porcentaje de recuperación de los analitos. La metodología III presentó un ligero incremento en los recobros con respecto a la metodología I, el cual se debe a que se disminuyeron pasos en el manejo de las muestras.

V-5.2 Evaluación del efecto de la muestra (grano de cacao)

El efecto de la matriz se evaluó en la MIII; esta prueba se realizó con grano de cacao y la adición de estándares, se adicionaron 12.5, 5.0 y 1.5 mg de cada uno de los analitos (cafeína y teobromina) a un 1 g aproximadamente de grano molido de cacao, posteriormente se analizó cada una de las muestras. La concentración obtenida a partir de las muestras sin fortificar se empleó para discriminar entre la cantidad de los analitos inherentes a la muestra y la cantidad adicionada.

Se evaluó el porcentaje de recobro para cada uno de los casos, los resultados se observan en la figura 12. Puede observarse que se obtienen porcentajes de recobro ligeramente menores para la cafeína respecto a la teobromina debido al proceso de extracción líquido-líquido al cual esta sujeta. Una mayor variación se observó a menores cantidades en la adición de los analitos, eso es debido principalmente al efecto de la homogeneidad de la muestra.

Este comportamiento no es de extrañar ya que la homogeneidad de la muestra sólida es difícil de lograr, permitiéndose variaciones de hasta un 10 % en este tipo de muestras^[25]. La linealidad de esta prueba muestra que hay correlación mayor al 99 %, la cual es aceptable e indica que el método se comportará de manera lineal para el intervalo de concentraciones establecidas.



Cantidad adicionada (mg)	Teobromina	Cafeína
	% recobro	% recobro
12.5	98.35 ± 0,68	96.4 ± 1,12
5.0	93.00 ± 0,37	90.0 ± 0,16
1.5	87.00 ± 0,17	80.9 ± 0,20

Figura (12) Porcentaje de recobro y gráficos de cantidad adicionada vs cantidad recuperada de cafeína y teobromina en una muestra de granos de cacao. $n=9, \alpha=0.05$.

V-6 ESTUDIO DE LA OPTIMIZACIÓN PARA EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS FOCALIZADAS PROPUESTO.

La optimización de este proceso se llevó a cabo utilizando grano de cacao sin desengrasar y se realizó mediante un diseño factorial de 2^3 con el fin de optimizar y establecer los parámetros óptimos de extracción de cafeína y teobromina. Los parámetros a evaluar fueron: potencia, tiempo de irradiación y el volumen del disolvente, esto se realizó con la ayuda del software statgraphics plus 2.1 [30].

El propósito principal fue extraer la mayor cantidad de teobromina y cafeína del grano de cacao. Una vez que se obtuvo el extracto, los compuestos se separaron mediante el mismo procedimiento de extracción líquido-líquido.

V-6.1 ESTUDIO FACTORIAL 2^3

Para el estudio se utilizó *Statgraphics* plus 2.1 para Windows como herramienta estadística, y posteriormente un análisis de varianza. El modelo experimental estudia tres factores de entrada, estos corresponden a los parámetros que fueron (potencia, tiempo de irradiación y el volumen del disolvente), y un factor de salida, que es la absorbancia o la concentración calculada. Se eligieron tres puntos centrales con el fin de determinar la precisión del método vía un análisis de varianza [28,29].

Se denominaron a los factores con letras (A, B y C) y a los niveles altos y bajos de factores con los signos (+, -), se establecieron las combinaciones de tratamientos. Sean los factores: **A**: potencia; **B**: tiempo de irradiación y **C**: volumen del disolvente. Una vez definido lo anterior se desarrolla la tabla de los signos positivos y negativos (ver tabla 14), a partir de los contrastes, positivo con el nivel alto y negativo con el nivel bajo. Esto con la finalidad de construir el gráfico de pareto y poder visualizar cual de los factores tiene un mayor impacto sobre la extracción. Los valores de los puntos centrales no son considerados para la construcción del gráfico de pareto, debido a que como se menciona con anterioridad estos valores son para evaluar a precisión del estudio.

Con lo que la combinación de los tratamientos del diseño será:

# de experimento	Factores					
	A	B	C	AC	BC	AB
1	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	-	+	-
3	-	+	-	+	-	-
4	+	+	-	-	-	+
5	-	-	+	-	-	+
6	+	-	+	+	-	-
7	-	+	+	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+

Tabla (14). Construcción del diseño 2^3

En la tabla 15, se muestran los experimentos realizados para este diseño distribuidos de manera aleatoria lo que da un total de 11 experimentos, de los cuales 8 corresponden al estudio de los valores máximos y mínimos, mientras que los experimentos 1, 7 y 10 a los puntos centrales (valores medios para calcular la precisión).

Los valores mínimos y máximo para cada parámetro en cada uno de los experimentos se establecieron en función de los obtenidos por la metodología de extracción por agitación.

Para la potencia se estableció un intervalo de 30 - 70 % ya que en pruebas preliminares la temperatura del disolvente de extracción (agua) a potencias superiores a 70 % presentaba ebullición. Para el valor mínimo (30 %) se estableció en función de que en un tiempo superior a dos minutos el solvente llega a la temperatura óptima de extracción (80°C) y se mantiene durante el tiempo que le corresponde a cada experimento determinado. Para el tiempo de irradiación se estableció un valor entre 1-3 minutos con la finalidad de evaluar una disminución en el tiempo de extracción de los analitos mediante esta técnica, considerando que la temperatura se estableciera en un intervalo de $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para el volumen del disolvente se eligió un valor máximo de 100 mL y un mínimo de 25 mL (tomando en cuenta la adición del Reactivo de Carrez I), estos valores se determinaron basándose en que el volumen mínimo tenía que abarcar una proporción adecuada en el tubo colector del sistema de microondas para que la muestra estuviera en contacto constante con el disolvente y con la

energía de microondas, el volumen máximo se estableció con base a las observaciones obtenidas en la metodología que emplea agitación.

Numero de experimento	POTENCIA (%)	TIEMPO DE IRRADIACIÓN (min.)	VOLUMEN DE DISOLVENTE (mL)	Teobromina (mg/g)	Cafeína (mg/g)
1	50	2	62.5	9.6	0.805
2	30	3	100	7.49	0.570
3	70	1	25	12.26	0.830
4	30	3	25	11.29	0.860
5	30	1	25	10.73	0.742
6	70	3	25	13.58	0.808
7	50	2	62.5	9.76	0.843
8	70	1	100	9.38	0.724
9	70	3	100	15.58	0.905
10	50	2	62.5	10.51	0.817
11	30	1	100	6.90	0.505

Tabla (15). Diseño experimental 2³ para optimizar las variables de la extracción asistida por microondas

V-6.2 Gráfico de Pareto

El efecto de un factor está definido como el cambio en la respuesta producido por el cambio en el nivel de un factor [29]. Por ejemplo, el efecto del factor A se calcula como la diferencia en la respuesta promedio del nivel bajo y la respuesta promedio del nivel alto (ver tabla 14), tomando como referencia los signos del respectivo factor A en la tabla 14.

$$\text{Efecto del factor X} = \frac{\text{suma de los valores superiores de un factor}}{\text{número total de observaciones}} - \frac{\text{suma de los valores inferiores de un factor}}{\text{número total de observaciones}}$$

Empleando el mismo algoritmo se calculan los efectos de los demás factores e interacciones, y se construye el gráfico de Pareto (ver Figura 13 y 14).

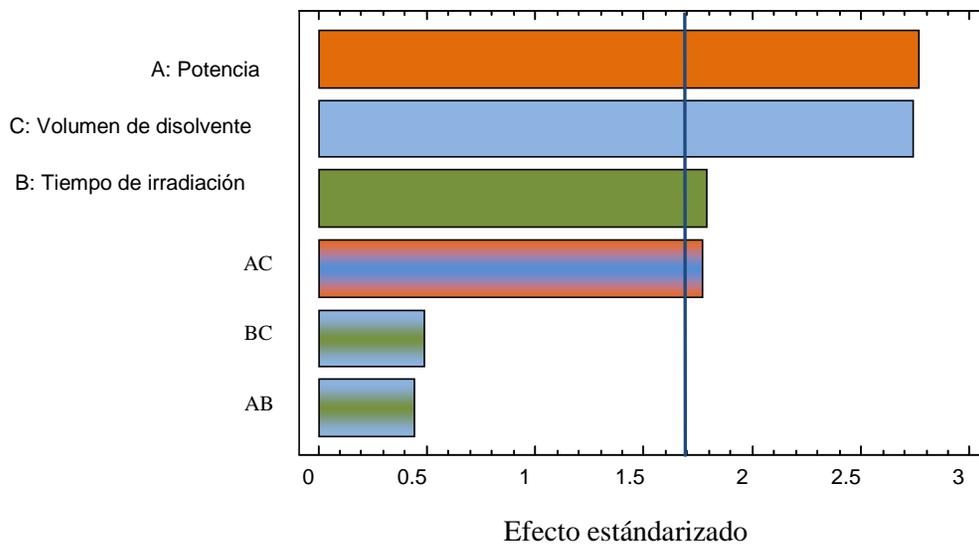


Figura (13). Pareto para teobromina en el diseño 2^3 . Se gráfica el efecto de los factores evaluados.

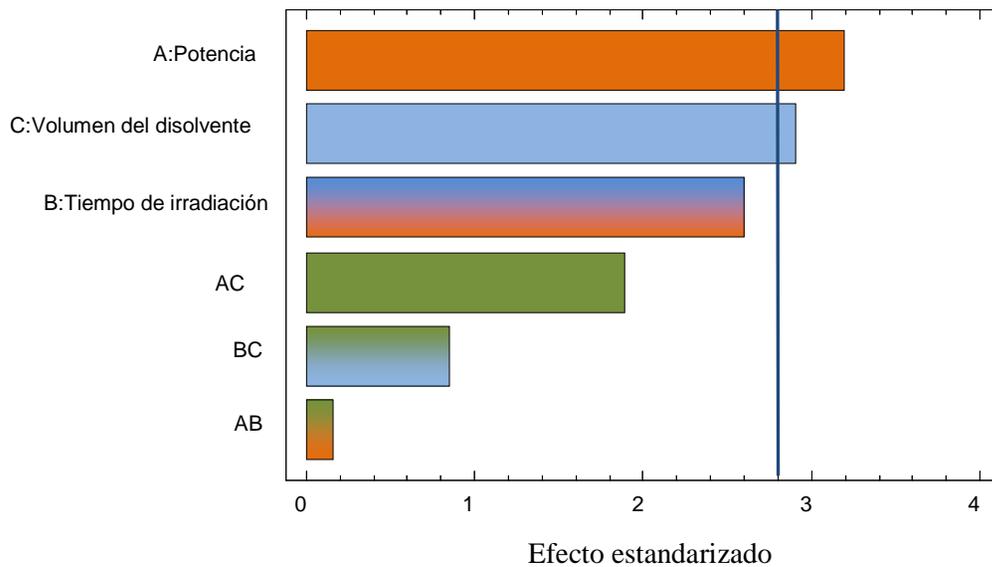


Figura (14). Pareto para cafeína en el diseño 2^3 . Se gráfica el efecto de los factores evaluados.

Evaluando los efectos de los factores sobre cada analito (teobromina y cafeína), es posible distinguir los factores influyentes sobre la extracción, y con ello concluir que el factor A y C presentaron un impacto significativo en la extracción.

V-6.3 Gráfico de superficie de respuesta

Para obtener los valores óptimos de cada uno de los factores (**A**: potencia; **B**: tiempo de irradiación y **C**: volumen del disolvente), una vez realizado el diseño experimental, el software evalúa el óptimo mediante un sistema de ecuación de regresión lineal múltiple para cada analito, las ecuaciones generadas para cada modelo son:

$$\text{Teobromina} = 15.1337 - 0.0588333*A - 1.92396*B - 0.114083*C + 0.0415625* A *C + 0.00107833*A*C + 0.0154333*B*C$$

$$\text{Cafeína} = 0.916808 - 0.00132708* A + 0.0199271*B - 0.00709483*C - 0.000181875*A*B + 0.0000855833*A*C + 0.000519667*B*C$$

Con las ecuaciones anteriores se construyeron los gráficos de superficie:

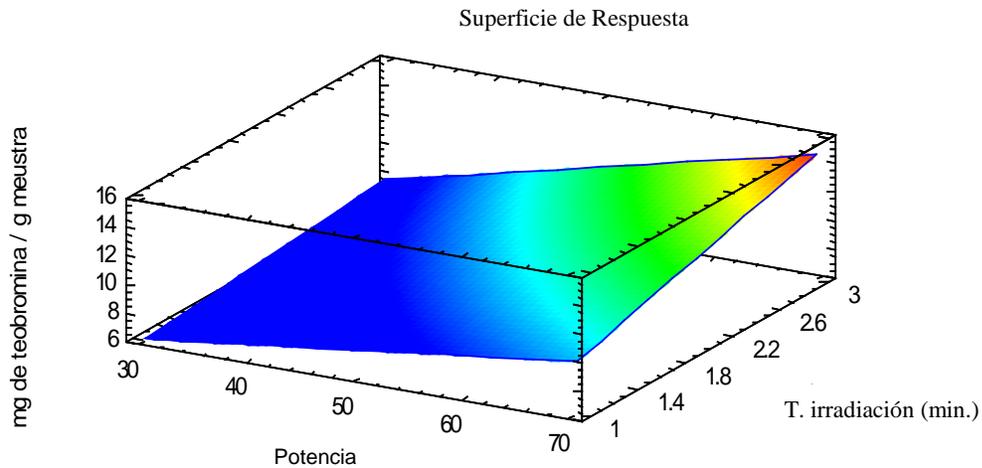
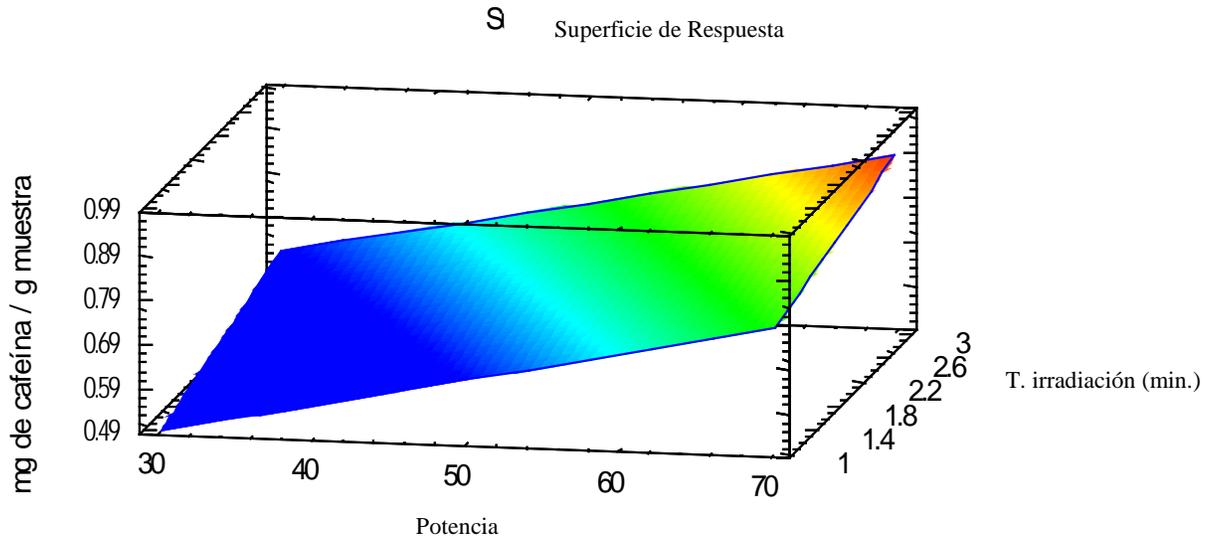


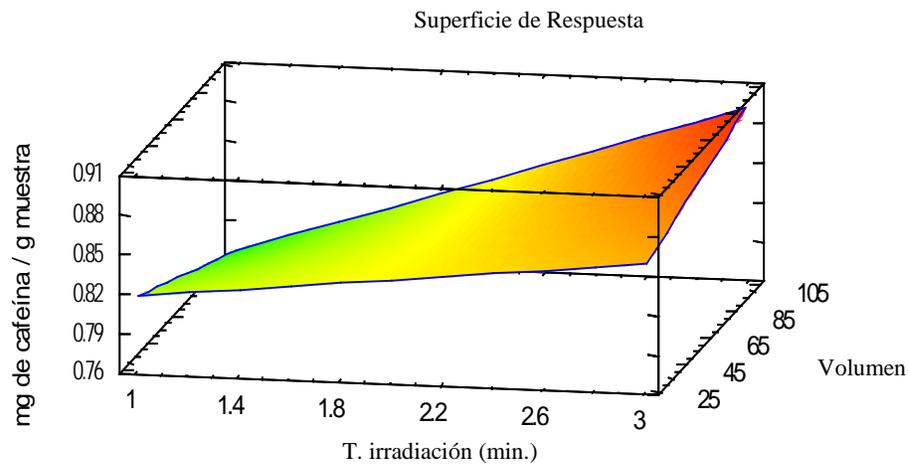
Figura (15). Influencia de los parámetros por EAMF para teobromina.



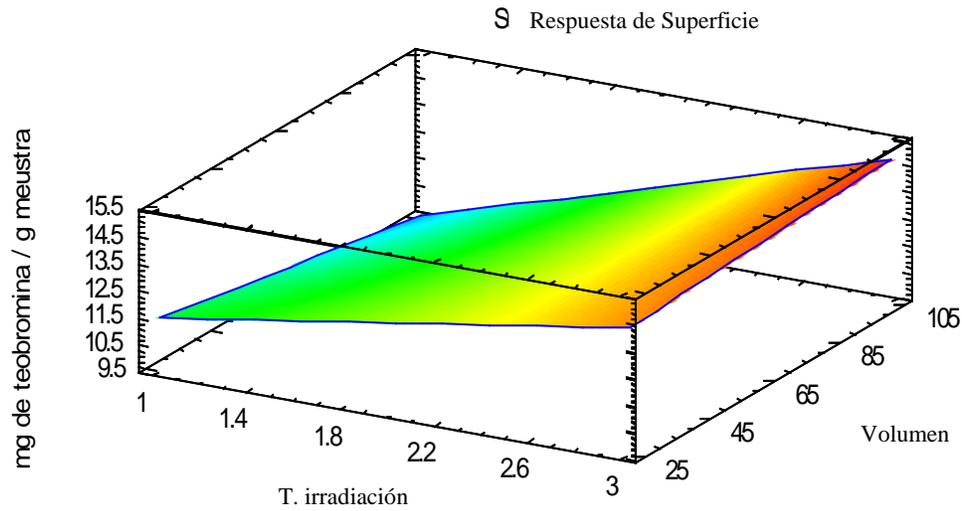
Figuras (16). Influencia de los parámetros por EAMF para cafeína.

En las figuras 15 y 16 se observa que al aumentar la potencia y el tiempo de irradiación se obtendrá una mejor extracción de los analitos, pero para conocer el impacto del factor C es necesario mantener una de los factores fijo para poder observar el óptimo volumen.

Entonces, las figuras 17 y 18 en donde se mantiene fijo el factor A, muestra que a mayores valores de volumen del disolvente se obtendrá una mejor extracción de los analitos.



Figuras (17). Superficie de respuesta de cafeína para el diseño 2^3 .



Figuras (18). Superficie de respuesta de cafeína para el diseño 2³.

Para este diseño, los valores óptimos de cada factor para maximizar la extracción de teobromina y cafeína se observan en la tabla 16.

<i>Factor</i>	<i>Óptimo</i>
Potencia	70.0
Tiempo de irradiación (min.)	3.0
Volumen de disolvente (mL)	100.0

Tabla (16). Condiciones óptimas de trabajo establecidas por el software.

Una vez que se obtuvieron estos parámetros, se realizaron dos experimentos adicionales; un experimento aumentando los tiempos de extracción y manteniendo fijas las variables de volumen (100mL) y potencia (70%). La figura 21, muestra que el mejor tiempo de extracción son 5 minutos, puesto que a 10 minutos el incremento en la cantidad encontrada de los analitos no sufre un aumento considerable.

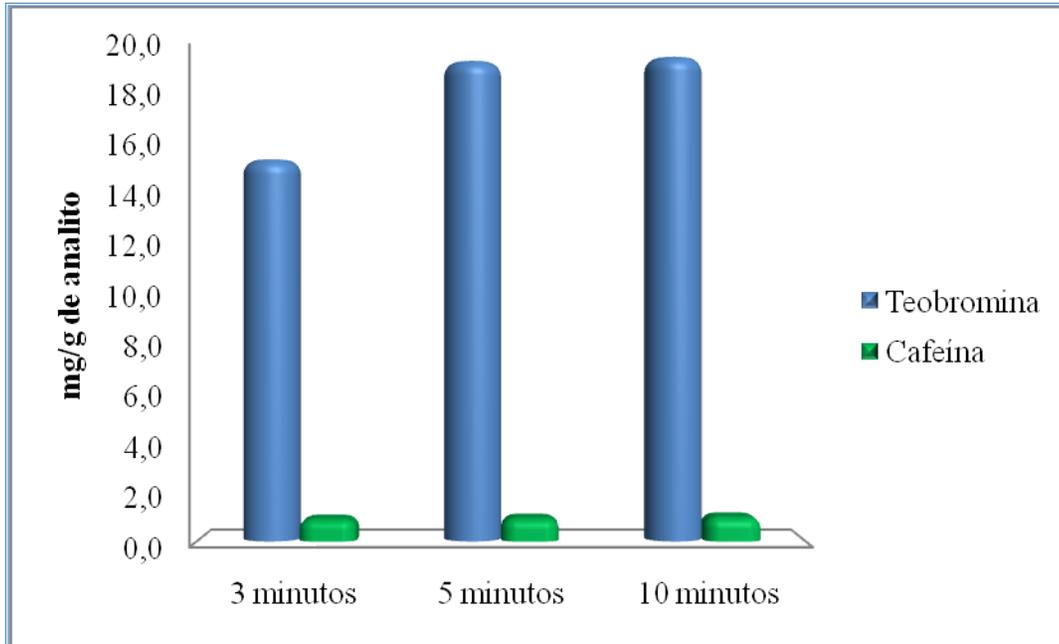


Figura 19. EAMF de cafeína y teobromina a diferente tiempos

En la tabla 17, se expresan los valores óptimos para la metodología propuesta.

<i>Factor</i>	<i>Óptimo</i>
Potencia	70.0
Tiempo de irradiación (min.)	5.0
Volumen de disolvente (mL)	100

Tabla (17). Condiciones óptimas de trabajo implementadas.

V-6.4 Análisis de varianza (ANOVA) de la EAMF para el diseño experimental 2³

Con el fin de determinar la confiabilidad y la influencia de los parámetros de estudio sobre el diseño experimental, se realizó el análisis de varianza. En la tabla 18, se muestran los resultados de ANOVA. En este caso para determinar el error del diseño experimental se utilizan los resultados de los experimentos del diseño; con lo anterior se obtiene el valor de F_0 para un grado de confianza del 95 % igual 3.48, este valor determina el límite en el cual podemos establecer con un 5 % del error en que una variable es significativa en el diseño experimental. Con ello se planteó la hipótesis nula (H_0).

Ho: Las varianzas entre determinaciones son iguales.

Fuente de variación	Suma de cuadrados		Grados de Libertad	Cuadrado Medio		Fo	
	CF	TB		CF	TB	CF	TB
A:potencia	0.042	26,87	1	0.042	26.87	9.87	20.69
B:tiempo de irradiación	0.015	10,04	1	0.015	10.04	3.55	7.73
C:volumen	0.035	9,62	1	0.035	9.62	7.35	7.41
AB	1.3 E ⁻⁴	5,51	1	1.3 E ⁻⁴	5.51	4.56	4.24
AC	0.033	5.24	1	0.033	5.24	7.76	4.04
BC	0.003	2.66	1	0.003	2.66	7.68	7.05
Error	0.017	5.19	4	0.004	1.29		
Total	0.147	65.15	10				

Tabla (18). Análisis de varianza $F_{0.05}=3.48$; donde TB (teobromina) y CF (cafeína).

En la tabla 18, se puede observar que F calculada para todos los casos de comparación es mayor con respecto a la de tablas, por lo que H_0 se rechaza y hay diferencia significativa entre las varianzas, por lo que todas las variables influyen en el método de extracción.

Una vez que se optimizó el método de extracción asistida por microondas focalizadas, se realizó la determinación de teobromina y cafeína en grano desengrasado, ya que como se vio en la metodología III, la grasa no influye en la pérdida de los analitos, sino más bien se requiere para cuantificar el contenido neto de los analitos. Así mismo se realizó la determinación de TB y CF en cáscara de grano y cacao en polvo.

V-7 CUANTIFICACION DE TB Y CF EN GRANO DESENGRASADO

Una vez que se optimizó la EAMF se cuantificó la TB y la CF en tres granos de cacao con grasa y sin desengrasar, con la finalidad de conocer si en la grasa contenida en las muestras los analitos se perdían.

Como se muestra en las figuras 20 y 21 se observa un aumento considerable en la extracción de los analito cuando el grano se desengrasa, sin embargo este aumento no es atribuible a que se obtenga más de los analitos cuando el grano esta desengrasado, sino mas bien en proporción del peso cuando se realiza el ajuste, aproximadamente se extrae un 20 - 30 % de grasa.

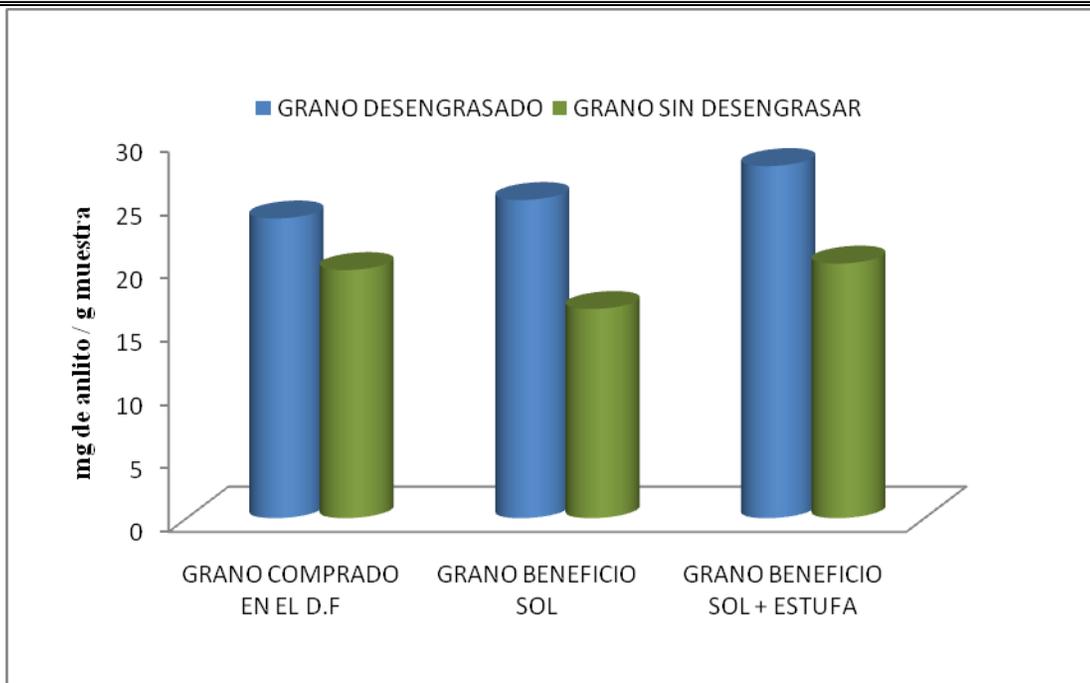


Figura (20) Cuantificación de teobromina en grano de cacao con diferente tratamiento de beneficio.

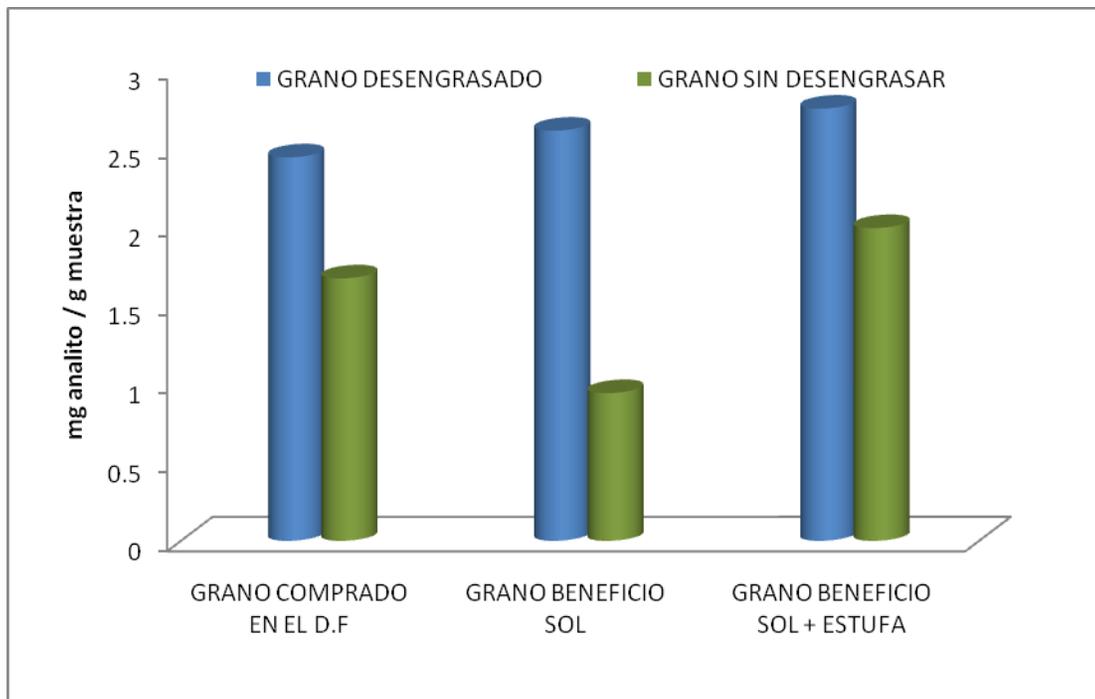


Figura (21) Cuantificación de cafeína en grano de cacao con diferente tratamiento de beneficio.

V-8 EVALUACIÓN DE ALGUNOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LA EAMF

Se evaluó la confiabilidad del método EAMF, con los siguientes parámetros: porcentaje de recobro y precisión como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

V-8.1 Porcentaje de recobro: Se adicionaron 2.5 mg de cada uno de los estándares de cafeína y teobromina a una cantidad pesada de cacao, posteriormente se analizó cada una de las muestras.

Los resultados se observan en el figura 22, para todas las muestras de cacao, se obtienen porcentajes de recobro entre 90-106%, lo que establece que la metodologías de estudio presenta una recuperación dentro de los límites de aceptación establecidos para la validación de un método analítico.

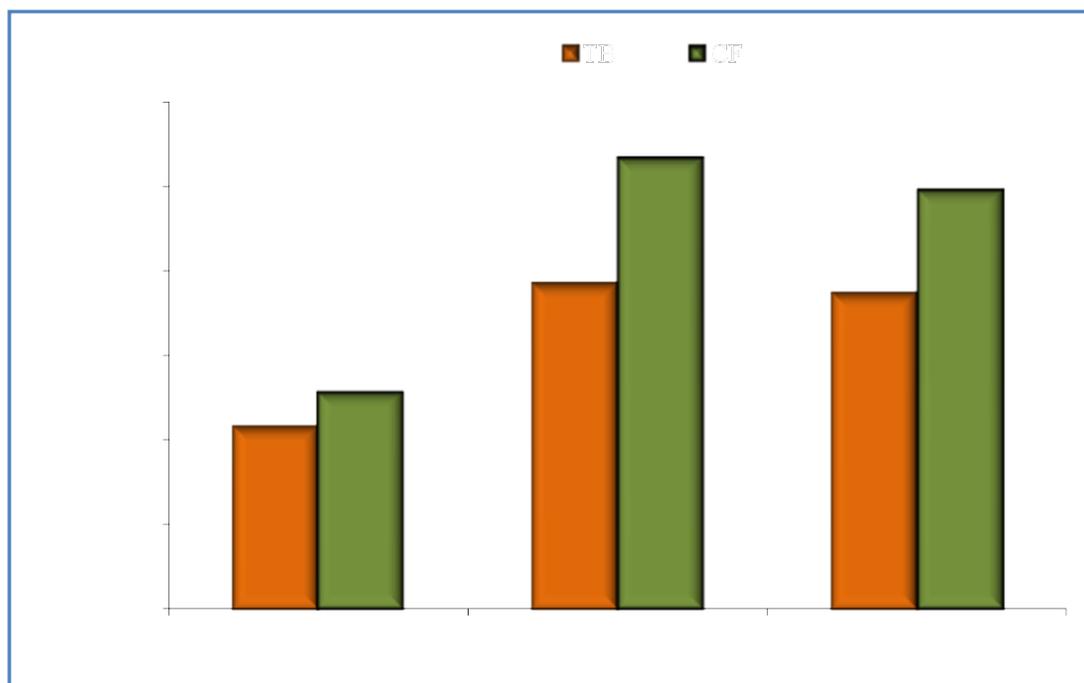


Figura (22) Porcentaje de recobro de los estándares TB y CF en las diferentes muestras de cacao por la EAMF.

V-8.2 Precisión: se evaluó por triplicado con pesadas independientes calculándose la desviación estándar relativa (DER) para cada caso. La tabla 19, muestra las DER obtenidas para los analitos. Puede observarse en todos los casos la DER es menor al 5%, la cual se ubica por debajo de los límites aceptables que puede llegar a ser del 10% cuando se trabaja a concentraciones del orden de los mg/kg.

PRECISIÓN		
Muestras	TB (mg/g)	CF (mg/g)
Grano de cacao	24.84 ± 1.07%	2.28 ± 0.616 %
Cocoa en polvo	29.77 ± 0.802%	1.97 ± 0.073 %
Cáscara de grano de cacao	13.01 ± 0.114%	0.961 ± 1.19%

Tabla (19). Desviación estándar relativa obtenida para cada analito.

V-8.3 Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

Éstas se evaluaron con el grano de cacao desengrasado y durante 7 días de análisis por duplicado bajo las mismas condiciones de trabajo, el mismo analista, en los mismos equipos y pesadas independientes^[30]. En la tablas 20 y 21, se muestran los valores de mg/g de cada analito.

Teobromina		
Días	Réplica 1	Réplica 2
1	24.71	24.76
2	24.63	24.68
3	24.72	24.77
4	24.97	24.99
5	25.00	24.99
6	24.88	24.95
7	25.01	25.02

Tabla (20). Repeticiones de la cantidad encontrada de teobromina en el grano de cacao, para estimar la reproducibilidad intralaboratorio. Los valores están expresados en mg/g de Teobromina.

Cafeína		
Días	Replica 1	Replica 2
1	2.33	2.35
2	2.28	2.32
3	2.29	2.34
4	2.31	2.28
5	2.27	2.29
6	2.34	2.30
7	2.29	2.31

Tabla (21). Repeticiones de la cantidad encontrada de cafeína en el grano de cacao, para estimar la reproducibilidad intralaboratorio. Los valores están expresados en mg/g de Cafeína.

Para constatar la confiabilidad de nuestro método se realizó un ANOVA de variación entre y dentro de los días de análisis (ver tabla de resultados 22).

Tabla (22) de ANOVA para la teobromina

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre días	0.007	6	0.0012	2.657	0.1135	3.866
Dentro de días	0.003	7	0.0005			
Total	0.011	13				

Como el valor de F calculado 2.67 no es superior al valor de crítico de $F_{6,7 \alpha=0.05}$ 3.86 no existe evidencia estadística para asegurar que los valores medios de concentración de teobromina de las determinaciones de los siete días de estudio difieren significativamente. Se calculó la repetibilidad relativa dentro de los días S_R y la reproducibilidad relativa entre días S_{WR} [22,26], a continuación se muestra el ejemplo del cálculo para teobromina.

$$S_R = \sqrt{0.0005} = 0.022$$

$$DER = \left[\frac{0.022}{24.86} \right] = 0.0008 \times 100 = 0.090\%$$

$$S^2 = \frac{(0.0012 - 0.0005)}{2} = 3.5 \times 10^{-4}$$

$$S_{WR} = 0.0005 + 3.5 \times 10^{-4} = \sqrt{8.50 \times 10^{-4}}$$

$$DER = \left(\frac{0.0292}{24.86} \right) 100 = 0.117\%$$

Realizando lo mismo para los datos obtenidos con cafeína el cuadro ANOVA (tabla 23) es:

Tabla (23) de ANOVA para la cafeína

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre días	0.0046	6	0.0008	1.372	0.342	3.866
Dentro de días	0.0039	7	0.0006			
Total	0.0085	13				

Como el valor de F calculado 1.372 no es superior al valor de crítico de $F_{6,7 \alpha=0.05}$ 3.866 no existe evidencia estadística para asegurar que los valores medios de concentración de cafeína de las determinaciones de los siete días de estudio difieren significativamente. El valor de la repetibilidad relativa dentro de los días fue 1.06%, y de la reproducibilidad relativa entre días 1.15%.

V-9 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN (EAMF vs MIII)

Se comparó la metodología de extracción asistida por microondas focalizadas (EAMF) contra la metodología con extracción por agitación (MIII), realizando una prueba de t de student y una prueba de F, con la finalidad de evaluar si hay una diferencia significativa entre estas dos extracciones.

En las figuras 23 (teobromina) y 24 (cafeína), se muestra la cantidad encontrada de ambos analitos en las diferentes muestras de análisis, se observa que con EAMF hubo una mayor extracción que con MIII.

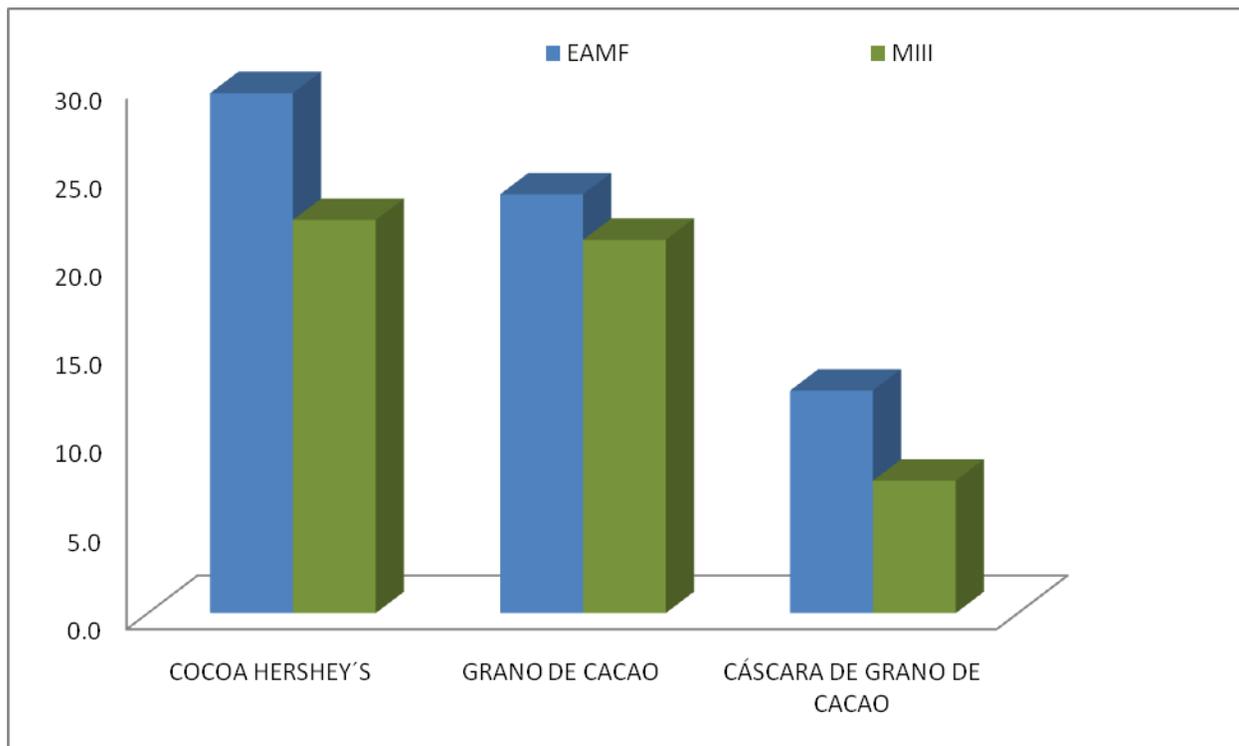


Figura (23) Comparación entre EA y EAMF de la cantidad encontrada de TB en las diferentes muestras de cacao.

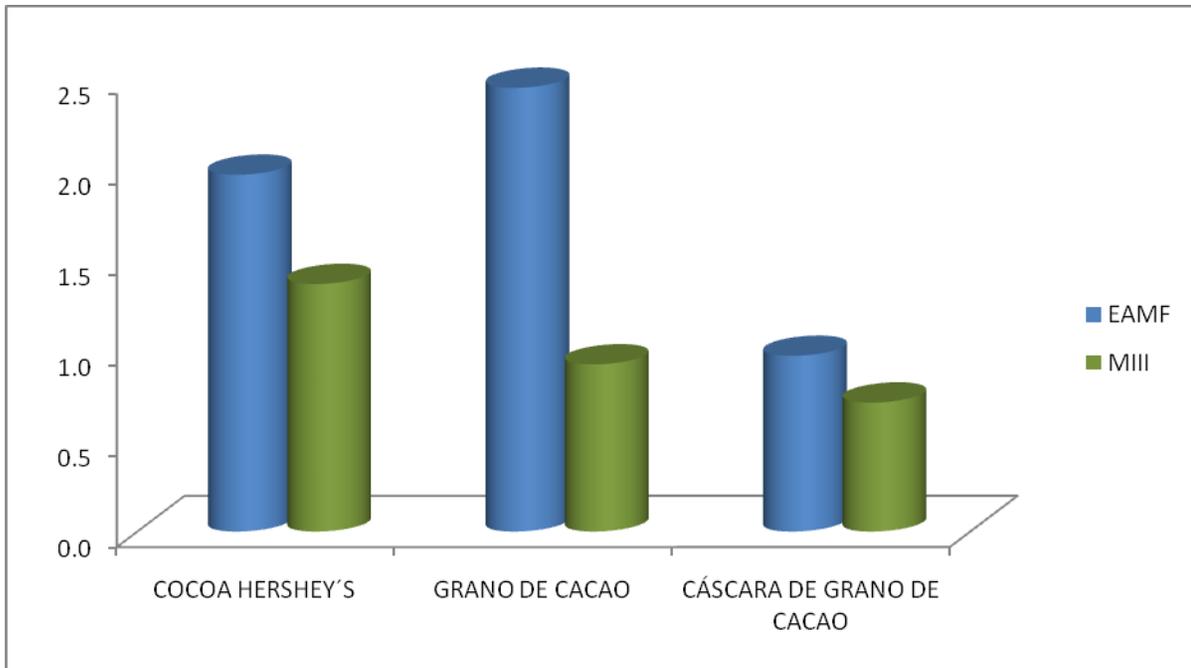


Figura (24) Comparación entre EA y EAMF de la cantidad encontrada de CF en las diferentes muestras de cacao.

V-9.1 PRUEBA DE F

Esta prueba nos refleja si existe una diferencia estadísticamente significativa en un nivel de confianza del 95 %; para lo cual se requiere plantear una hipótesis nula (H_0).

H₀: La varianza de la EAMF es igual con respecto a la de la MIII

Las tablas 24 y 25, contienen los valores de las varianzas de las determinaciones realizada en la muestras de cocoa en polvo, grano de cacao y cáscara de grano de cacao para cada metodología. F calculada se denomina F_0 y es la razón de las varianzas calculadas de cada metodología que se compara.

MIII		
Muestras	TB	CF
Grano de cacao	0.62	0.00013
Cocoa en polvo	0.69	3.8×10^{-06}
Cáscara de grano de cacao	0.08	0.00042

Tabla (24). Valor de la varianza de TB y CF en las diferentes muestras de análisis. Para todos los casos se tienen 3 observaciones y dos grados de libertad.

EAMF		
Muestras	TB	CF
Grano de cacao	0.21	0.00023
Cocoa en polvo	0.057	2.01×10^{-06}
Cáscara de grano de cacao	0.35	0.00013

Tabla (25). Valor de la varianza de TB y CF en las diferentes muestras de análisis. Para todos los casos se tienen 3 observaciones y dos grados de libertad.

Las F calculadas (Fo) se presentan en la tabla 26, junto con el valor de F crítico, que se obtiene de tablas.

Muestras	Fo para teobromina	Fo para cafeína
Cocoa en polvo	12.14	1.91
Grano de cacao	2.90	1.75
Cáscara de grano de cacao	4.14	3.14
F (crítico) $\alpha=0.05$	19	

Tabla (26) Valores de Fo y F crítico

Por lo tanto para todos los casos de análisis en las muestras de cacao se planteo Ho :

$$F_{2, 2 \alpha = 0.05} = 19$$

$$F_{calculada} < 19$$

Se acepta la hipótesis nula, lo que significa que no existe una diferencia significativa de varianzas entre las dos metodologías a comparar en un nivel de confianza del 95 %, por lo tanto ambas metodologías son precisas

V- 9.2 PRUEBA DE t STUDENT

Se plantea la hipótesis nula (H_0) para conocer si los valores mostrados en las figuras 23 y 24 son diferentes o iguales estadísticamente en función de la media (que es valor encontrado experimentalmente de la cantidad de TB y CF por ambas metodologías), y poder concluir por cuál de las dos metodologías hay mayor extracción de los analitos. Las tablas 27 y 28, muestran los valores de las medias de las concentraciones de teobromina y cafeína encontradas en cada muestra.

H₀: La media de la MIII es la misma con respecto a la EAMF

MIII		
Muestras	TB	CF
Grano de cacao	21.13	0.92
Cocoa en polvo	22.26	1.37
Cáscara de grano de cacao	7.50	0.71

Tabla (27). Valor de la media calculada de TB y CF en las diferentes muestras de análisis. Para todos los casos se tienen 3 observaciones y tres grados de libertad.

EAMF		
Muestras	TB	CF
Grano de cacao	23.04	2.30
Cocoa en polvo	29.77	1.97
Cáscara de grano de cacao	12.60	0.96

Tabla (28). Valor de la media calculada de TB y CF en las diferentes muestras de análisis. Para todos los casos se tienen 3 observaciones y tres grados de libertad.

Muestras	t para teobromina	t para cafeína
Cocoa en polvo	15.02	428.83
Grano de cacao	6.38	17.89
Cáscara de grano de cacao	32.37	18.73
t (crítico) $\alpha=0.05$	3.18	

Tabla (29) Valores de t calculada y t crítico

La tabla 29, muestra los valores del cálculo estadístico de la prueba de t para cada caso de análisis y poder aceptar o rechazar H_0 planteada con anterioridad

Para todos los casos de análisis en las muestras de cacao, se planteo H_0 (donde t_0 es la t calculada):

$$t_{3,3 \alpha = 0.05} = 3.18$$

$$t_0 > 3.18$$

Por lo tanto se rechaza H_0 , siendo la diferencia que se muestra en los gráficos 23 y 24 estadísticamente significativa, demostrando con ello que la EAMF fue mejor técnica de extracción de cafeína y teobromina para todos los casos.

La EAMF redujo considerablemente el tiempo de análisis (80%) con respecto a la MIII, debido que para llegar a la temperatura óptima de extracción se necesita 1 min a la potencia que se estableció (70 %), mientras que la MIII requiere de un mayor tiempo, además de que es necesario colocarse en baño maría para poder tener un mejor control sobre la temperatura total del sistema de extracción. En la tabla 30, se observa la eficiencia del EAMF sobre la MIII, para cada una de las muestras analizadas, se pudo observar que la EAMF favorece la extracción de los analitos en un intervalo del 10-150 %, cabe señalar que la extracción de cafeína se vio más favorecida para grano y cocoa en polvo.

Muestras	EFICIENCIA (%)	
	TB	CF
Grano de cacao	9.03	150
Cocoa en polvo	32.07	43.80
Cáscara de grano de cacao	68.00	35.21

Tabla (30). Porcentaje de eficiencia de la EAMF con respecto a la MIII, para cada uno de los alcaloides encontrados en cada una de las muestras de análisis.

CONCLUSIONES

VI- CONCLUSIONES

En la metodología por agitación (MIII), se utilizaron reactivos menos tóxicos que los empleados en las metodologías MI y MII. Se sustituyó el acetato de plomo por el acetato de zinc y el ferrocianuro de potasio por el bicarbonato de sodio; estos reactivos se emplearon para eliminar las interferencias de taninos y proteínas de alto peso molecular del extracto de grano de cacao, cocoa en polvo y cáscara de cacao.

Los granos de cacao a evaluar mostraron ser de buena calidad en cuestión a las pruebas físico-químicas realizadas en este trabajo de investigación; demostrando también, que las partes más importantes del beneficio de las vainas del cacao es la fermentación y el proceso de secado, procesos donde comienza la formación de los componentes (polifenoles, aroma, cafeína y teobromina, etc.) que caracterizan el sabor y propiedades del grano de cacao.

Con la extracción asistida por microondas focalizadas se demostró que el uso de este tipo de energía acelera el proceso de extracción de los analitos (cafeína y teobromina) en productos de cacao, reduciendo el tiempo total de análisis en un 80% y obteniéndose un incremento en la eficiencia de extracción del 10-70% para teobromina y del 35-150 % para cafeína con respecto a la extracción por agitación.

Los resultados también mostraron que la cáscara del grano de cacao que no es consumida es una buena fuente de obtención de teobromina y cafeína, y esto se puede prestar a que en la cocoa en polvo se pulverice la cáscara y se mezcle, ocasionando una cocoa de baja calidad.

Se determinó que la extracción por reflujo durante una hora disminuye el recobro de los analitos en más de un 30 %. La linealidad de los métodos empleando EAMF y EA fue aceptable al obtenerse coeficientes de correlación superiores al 0.99 para todos los casos.

La determinación por ultravioleta es una técnica más económica y fácil de operar, que puede ser utilizada en laboratorios de análisis rutinario.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) H. D. Belitz, et. all. **Química de los alimentos**. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España). (1992) 1035-1047.
- 2) www.devida.gob.pe/Documentacion/documentosdisponibles/Manual%20Cacao.16/01/2009.14:19.
- 3) www.antad.net/.19/02/2009.14:60.
- 4) Purification and characterization of caffeine synthase from Tea Leaves. **Kato Misako, et.al.**, 1999, American Society of Plant Physiologist, Vol. 120, pp 579-586.
- 5) Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Hiroshi Ashihara, Hiroshi Sano, Alan Crozier**. 2007, ScienceDirect, pp. 841-856.
- 6) A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilization of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. **Koshiishi Chie, et. al.**, 2001, FEBS Letters, pp. 50-54.
- 7) The Merck Index. Thirteen Edition, Merck & Co, WhiteHouse Station NJ, 2201.
- 8) www.fundacite-ulia.gov.ve/fnd.16/01/2009.14:25.
- 9) Quantification of theophylline in plasma by reversed-phase ion interaction high-performance liquid chromatography and comparison with the TDx fluorescence polarization immunoassay procedure, **M.C. Gennaro, C. abrigo, P. Biglino**, 1992, analyst, volume 117, pp.1071-1074.
- 10) Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies. **Tziomus E., Ptolemy A.S., et al.**, 2010, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, pp. 409-419.
- 11) Rapid determination of theophylline, theobromine and caffeine in dietary supplements containing guaraná by ultra-performance liquid chromatography. **Hasegawa T., Takahashi K., Saijo M., Ishii T., Nagata T.** 2009, Journal Food Hygienic Society of Japan, pp. 304-310.

-
-
- 12) Caffeine and Theobromine selectivity using molecularly imprinted polypyrrole modified electrodes. **Vinjamuri A.K., Burns S.C., Dahl D.B.**, 2008, ECS Transactions, pp. 9-20.
 - 13) Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. **Spataru N., Sarada B.V., Tryk D.A., Fujishima A.** 2002. Electroanalysis, pp 721-728.
 - 14) Amperometric detection of three purine alkaloids following their separation by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Wang A., Li L., Zang F., Fang Y.** 2000. Analytica Chimica Acta, pp. 235-242.
 - 15) High-performance liquid chromatography procedure for the determination of flavor enhancers in consumer chocolate products and artificial flavors. **Risner C.H., Kiser M.J.**, 2008. Journal of the Science of Food and Agriculture, pp. 1423-1430.
 - 16) Manual del equipo de extracción sólido-líquido, Universidad Nacional de Colombia.
 - 17) Moreno, Pedro y Urdaneta, Mario. **Laboratorio de química Orgánica I Manual de prácticas.** Universidad Nacional de Colombia, 1985.
 - 18) Review. Analytical-scale microwave assisted extraction. **Sparr Eskilsson C. and Björklun Erland**, 902 (2000), Journal of Chromatography A. pp. 227-250.
 - 19) Microwave-assisted process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory. **Paré Jocelyn J. R. and Bélanger Jacqueline M. R.**, 13 (1994), Trends in Analytical Chemistry, pp.176-184.
 - 20) Microwave-Enhanced Chemistry. **Jassie L.; Revesz R.; Kierstead T.; Hasty E. and Metz S.** 1997, American Chemical Society, Washington, DC. pp 569.
 - 21) Jiménez, Martínez Thania. **Determinación del contenido de agua en muestras de especias y granos de café por medio de la extracción asistida con ultrasonido y la detección con el reactivo de Karl Fisher en línea.** Tesis de Maestría. Pág.42-44.

-
-
- 22) Luque-García J.L. and Luque de Castro M.D. **Where is microwave-based analytical equipment for solid simple pre-treatment going?** *Trends in Analytical Chemistry*. 22 (2003). 90-98.
- 23) Longares, Patrón Arturo. **Determinación espectrofotométrica de Vainilla y p-hidroxibenzaldehído a partir de extracción de Vanilla fragans utilizando microondas focalizadas.** Tesis de Licenciatura (2006). Pág. 5-17.
- 24) Determination of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in by-Products of Cupuacu and Cacao Seeds by High-Performance Liquid Chromatography. **Lo Coco F., Lanuzza G., Micali, Cappellano G.,** 2007, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 45, pp. 273-275.
- 25) Miller, N. James y Miller, J. C. **Estadística y Quimiometría para Química Analítica.** 4ªed. Editorial Prentice Hall. Madrid 2002. 21-30, 50-64 pp.
- 26) Álvarez, Porebski Piotr Victor. **Desarrollo y evaluación de dos métodos analíticos para la cuantificación de Tramadol y Guaifenesina en distintas formas farmacéuticas por HPLC.** Tesis de Licenciatura (2008). pág. 46-50.
- 27) **Guía de validación de métodos analíticos.** (2002). Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México.
- 28) Montgomery, Douglas C. **Diseño y análisis de experimentos.** 2ªed. Editorial Limusa Wiley, Año 2010. 33-45, 60-70 pp.
- 29) Statgraphics Plus para Windows version 2.1, Rockville, M.D., 1992.
- 30) Massart D.L., Vandeginest B.G.M., L.M.C., de Jong S., Lewi P.J., Smeyer J., **Handbook of chemometrics and qualimetric:Part A. Data handling in science and technology,** Ed. Elsevier, New York, pp. 380-390.

Fórmulas y algoritmo empleado para calcular los estimados estadísticos para cada gráfico de las curvas de calibración de Cafeína y Teobromina

r = Coeficiente de correlación

n = Número de muestras

$S_{x/y}$:Desviación estándar que estima los errores aleatorios en la dirección de y .

S_b : Desviación estándar de la pendiente

S_a : Desviación estándar de la ordenada al origen

LD: Límite de detección

x_i = Concentración ($\mu\text{g/mL}$)

y_i = Absorbancias

\hat{y}_i = Valores de absorbancia ajustados el eje de x.

Fórmula para calcular la t de student:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Fórmula para calcular $S_{x/y}$:

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Fórmula para calcular S_b :

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Fórmula para calcular S_a :

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Fórmula para calcular LOD:

$$LD = y_b + 3s_b$$

