



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**INFLUENCIA DE LA RADIACION DE ULTRASONIDO EN LA
EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA Y TEOBROMINA EN CACAO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

PERALTA JIMENEZ ANA LAURA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: SILVIA DE JESUS MENDOZA ARELLANO**

VOCAL: **Profesor: MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS**

SECRETARIO: **Profesor: KARLA MERCEDES DÍAZ GUTIERREZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL**

2° SUPLENTE: **Profesor: ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EDIFICIO B; DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO LABORATORIO 105-106, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS

SUSTENTANTE: ANA LAURA PERALTA JIMENEZ

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	6
II. OBJETIVO	7
III.HIPOTESIS	7
IV.- MARCO TEÓRICO	7
IV.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	12
VI.1.1 ESPECTROSCOPIA.....	12
IV.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	14
V.2.1 EXTRACCIÓN MANUAL.....	15
IV.2.2 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS FOCALIZADOS (Método propuesto).....	15
IV.2.3 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS FOCALIZADOS.....	17
V.- METODOLOGÍA	18
V.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	18
V.2 INSTRUMENTOS Y APARATOS.....	19
V.3 MUESTRAS.....	19
V.4 TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	20
V.5 HUMEDAD	20
V.6 DETERMINACIÓN DE GRASA.....	20
V.7 REMOCIÓN DE GRASA	20
V.8 FORTIFICACIÓN.....	21
V.9 MÉTODO DE EXTRACCIÓN MANUAL.....	21
V.10 MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR MICROONDAS FOCALIZADAS.....	21
V.11 MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDOS FOCALIZADOS (Método Propuesto).....	21
V.12 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.....	22

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
VI.1 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA MÁXIMA DE ABSORCIÓN PARA TOBROMINA Y CAFEÍNA.....	23
VI.2 ELABORACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	23
VI.3 DETERMINACIÓN DE LIMITE DE DETECCIÓN.....	27
VII. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDO POR ULTRASONIDOS FOCALIZADOS	29
VII.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE CF Y TB.....	29
VII.2 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA DEL EXTRACTO ACUOSO.....	36
VIII. APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS A ESTÁNDARES	38
IX. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS Y EXTRACCIÓN MANUAL Y PRUEBA DE t STUDENT	39
IX.1 PARA CAFEÍNA Y TEOBROMINA.....	39
X. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS Y MICROONDAS Y PRUEBA DE t STUDENT	43
XI. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA EL MÉTODO MANUAL Y PARA EL MÉTODO MANUAL Y PARA EL MÉTODO POR ULTRASONIDOS	46
XI.1 MÉTODO MANUAL (CONVENCIONAL).....	46
XI.2 CASO 1: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA CF.....	47
XI.3 CASO 2: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA TB.....	48
XII. MÉTODO: ULTRASONIDOS FOCALIZADOS (PROPUESTO)	49
XII.1 CASO 1: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA CF.....	50

XII.2 CASO 2: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA TB.....	51
XIII. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	52
XVI. ANALISIS DE CHOCOLATES.....	54
XV. FORTIFICACIÓN.....	55
XVI. CONCLUSIONES.....	57
XVII.BIBLIOGRAFÍA.....	58
XVIII. ANEXO (ARTÍCULO).....	60

I. INTRODUCCIÓN

El cacao es un buen estimulante ya que la semilla contiene alcaloides tales como teobromina (TB) (1.2%) y cafeína (CF) (0.2%).

La determinación de TB y CF en suplementos alimenticios ha causado un gran interés debido a su gran consumo en la dieta y al efecto que estas metilxantinas pueden producir en combinación con otro tipo de sustancias, por ejemplo alcohol.

La TB y CF 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.

En este trabajo se cuantificó TB y CF a partir de diferentes muestras de cacao, mediante la optimización de un nuevo método en el cual la extracción se realiza mediante el uso de ultrasonidos focalizados, para ello se tomó en cuenta la solubilidad de la cafeína y la teobromina. Se realizaron dos extracciones simultáneas: la primera en agua, para obtener la mayor cantidad de cafeína y teobromina de cacao y sus derivados y la segunda usando cloroformo para separar la cafeína de la teobromina del extracto acuoso. Para la extracción de los analitos de las muestras se aplicó radiación de ultrasonidos por medio de una sonda.

Para la optimización se utilizó un diseño factorial 2^3 evaluando la potencia, volumen de extracción y tiempo de irradiación. Mediante un análisis de ANOVA se encontraron las condiciones óptimas: 240 W de potencia, 100mL de extractante y 180 segundos de tiempo de extracción. La eficiencia de extracción aumentó entre un 15% y un 25% para CF y entre 12% y 20% para TB comparado con el método convencional por agitación magnética. Y comparando con el método asistido por microondas focalizadas encontramos una diferencia no significativa.

Para la segunda extracción, se simplificó a extracción líquido-líquido utilizando la sonda ultrasónica: 10 segundos de extracción a una potencia de 160 W y 10mL de cloroformo.

Una vez optimizado el método, se analizaron muestras de cacao, tanto en grano como muestras comerciales y chocolates de diferentes marcas.

La extracción con ultrasonidos focalizados proporciona ventajas como son: 1) menor tiempo de extracción de ambos analitos de las muestras de cacao y derivados, 2) menor cantidad de cloroformo para la extracción de cafeína y 3) el procedimiento es mucho más fácil de manipular en comparación con el método de extracción manual y el método de extracción asistido por microondas focalizadas.

II.-OBJETIVO

- Llevar a cabo la optimización de un nuevo método de extracción (utilizando ultrasonidos focalizados) de teobromina y cafeína a partir del grano de cacao, cascarilla de grano de cacao y cocoa en polvo para su cuantificación por espectrofotometría ultravioleta.
- Realizar la comparación del método propuesto con US con dos métodos: manual y por microondas para determinar que metodología es la más indicada para la extracción de teobromina y cafeína de cacao.
- Reducir los tiempos y la cantidad de reactivos necesaria para la extracción de cafeína y teobromina.

III.-HIPÓTESIS

La energía de ultrasonido produce el fenómeno de cavitación provocando mayor presión y temperatura por lo que la extracción de teobromina y cafeína será más eficiente.

IV.- MARCO TEÓRICO

El árbol de cacao es una planta tropical que crece en climas cálidos y húmedos, concentrándose su producción en una banda estrecha de no más de 20 grados al norte y al sur de la línea Ecuatorial. Se cree que el árbol de cacao es originario de la Amazonia, y que más tarde se extendió a América Central, en especial México. Las culturas nativas de esta región por ejemplo los olmecas y los mayas, ya lo conocían y utilizaban, lo consideraban como “el alimento de los dioses”, [García Yanes M., 1994].

Theobroma cacao L. es el nombre científico que recibe el árbol de cacao o cacaotero, un árbol de pequeña talla, de 4 a 7 m de altura. El cacao silvestre puede crecer hasta veinte metros o más.

El fruto de este árbol, una baya grande comúnmente denominada “mazorca”, carnosa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso; cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial e incrustada en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa.

Dichas semillas son grandes del tamaño de una almendra, color chocolate o purpúreo, de 2 a 3 centímetros de largo y de sabor amargo, llamadas comúnmente como habas o granos, ricas en almidón, proteínas y materia grasa, lo cual les confiere un valor nutricional real.

Han evolucionado tres tipos de cultivares de cacao: el criollo desarrollado en el norte de Sudamérica y Centro América, el Forastero proveniente de la Cuenca Amazónica y el Trinitario localizado en Trinidad.

Tipo criollo: caracterizado por un fruto con frecuencia alargado, color verde frecuentemente con salpicaduras de rojo a púrpura oscuro. De este tipo se obtiene el chocolate de más alta calidad, tiene baja producción y es muy susceptible a enfermedades.

Tipo forastero: generalmente de forma ovalada y corta, de color verde o amarilla cuando está maduro. Dada su alta producción, domina la producción mundial.

Tipo trinitario: altamente variable dado su origen híbrido, es probable que se trate de una población segregante que se originó de una cruce entre Forastero y Criollo. En el comercio es conocido como cacao fino y su sabor de excelencia puede deberse en parte a su germoplasma criollo.

La semilla se usa como aromatizante, comestible; se muelen y tuestan para obtener la cocoa y el chocolate, sustancias apreciadas en la fabricación de dulces, confituras, helados y bebidas. Como cosmético; la manteca de cacao se usa para elaborar cosméticos, perfumería. Las semillas contienen hasta un 50 % de aceite. El aceite esencial contiene 50% de linalol, un ácido alifático y algunos ésteres. Es un buen estimulante, ya que la semilla contiene alcaloides tales como teobromina (1.2 %) y cafeína (0.2 %), que confieren propiedades estimulantes.

También es de uso medicinal su semilla, hojas, raíz y corteza, ya que contienen alcaloides; teobromina y cafeína tienen propiedades diuréticas y vasodilatadoras, se ha encontrado actividad antitumoral en la raíz y la corteza. La grasa que contienen las semillas se utiliza en farmacia como emoliente y para fabricar ungüentos y pomadas, [Berlitz, et al, 1992].

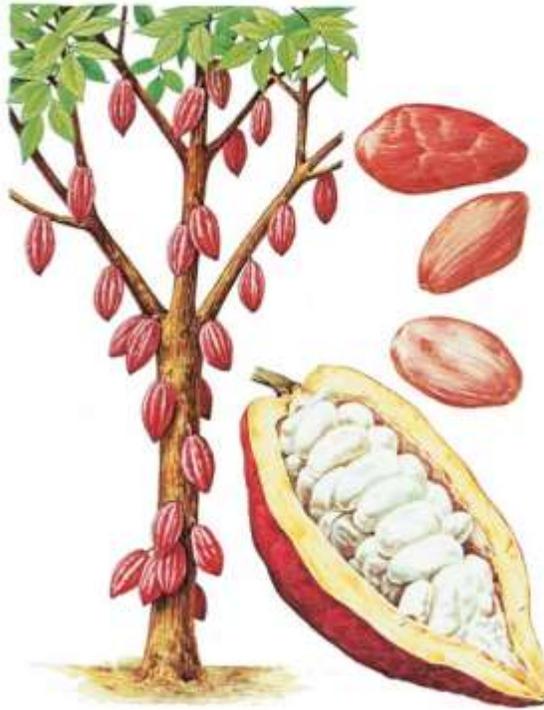


Fig. 1 Árbol de cacao.

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, concretamente pertenece a la familia de las metilxantinas, donde encontramos de igual forma a la teobromina, con estructura química similar y con equivalentes efectos en el organismo.

En estado puro es un sólido cristalino blanco inodoro en forma de agujas blancas o polvo. Soluble en agua, actúa en función directa de la temperatura, sin embargo tiene más afinidad por algunos disolventes orgánicos, como el cloroformo (CHCl_3) y el diclorometano (CH_2Cl_2), que a su vez son casi inmiscibles en agua.

Es un estimulante del sistema nervioso central, el sistema respiratorio, el aparato cardiovascular y permite a algunos músculos mayor facilidad en la contracción. También ejerce su acción sobre la función renal al aumentar el flujo sanguíneo a través del riñón y la disminución en la reabsorción de sal. Esto explica el efecto diurético del café. La cafeína tiene propiedades importantes como:

- Aporta energía y disminuye la depresión. La cafeína estimula el sistema nervioso, facilitando la coordinación, mejorando el estado de

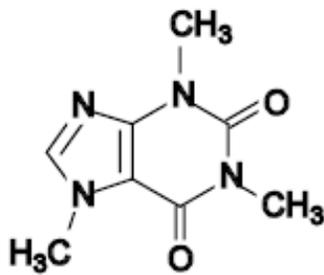
ánimo y la motivación. Incrementa la energía, la resistencia y la rapidez, disminuyendo el cansancio.

- Ayuda a estar alerta y concentrarte. Incrementa la capacidad de estar en un máximo estado de alerta y concentración. Al aumentar la actividad mental reduce el sueño.
- Reducción del dolor de cabeza. Reduce los dolores de cabeza, pues éste se debe a la tensión de los vasos sanguíneos del cerebro y la cafeína puede dilatarlos, reduciendo la intensidad del dolor. Ayuda a que los analgésicos tengan efecto más rápidamente.

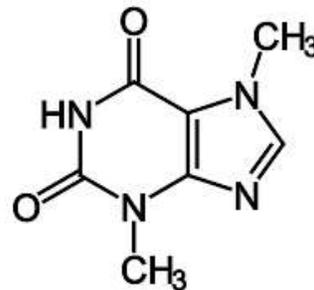
La dosis letal 50 (LD50) para el hombre es de 150-200 mg/Kg de peso corporal, que equivale al consumo de una sola vez de unas 75 tazas de café fuerte, [Derache, J., 1992].

La teobromina es similar en estructura (3,7-dimetilxantina-3,7-dimetil-2,6-dioxopurina), cristaliza como agujas en el sistema monocíclico, funde a 357 grados centígrados, sublima a 290 – 295 grados centígrados, es soluble en alcohol y agua. Insoluble en benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono.

Tiene efectos diuréticos, así como estimulante cardiaco y vaso dilatador y relajante muscular. Responsable de los efectos adictivos del chocolate.



CAFEÍNA



TEOBROMINA

Uno de los usos que se le da al cacao es la elaboración de chocolate, alimento que contiene teobromina, cafeína y teofilina, alcaloides pertenecientes al grupo de las purinas.

El chocolate contiene flavonoides (polifenoles), antioxidantes beneficiosos para la salud por la función que ejercen de: inhibición de oxidaciones por radicales libres, prevención del desarrollo de procesos cancerígenos y prevenir la degeneración de las células del organismo. La adición de leche al chocolate disminuye la concentración de estos principios y lo vuelve menos antioxidante. Las proteínas de la leche se fijan a los antioxidantes y dificultan la absorción de los

mismos. Por lo tanto, el chocolate puro es el que contiene más propiedades antioxidantes y del que se obtienen mayores beneficios.

Este alimento se confecciona con pasta de cacao o manteca de cacao, se pueden usar combinados o aislados. La pasta de cacao es la materia sólida que se obtiene al moler la semilla tostada sin cáscara ni germen (previamente extraídos) y sin la manteca. La manteca de cacao es la materia grasa obtenida a partir de las habas de cacao o sus fragmentos.

También puede contener azúcar, leche y aditivos como:

- Carbonato cálcico, carbonato potásico, ácido cítrico entre otros para controlar el grado de acidez.
- La lecitina, monoesterato de sorbitan, entre otros que tienen efecto emulsionante.
- La carragenina, goma de algarrobo y celulosa, como estabilizantes.
- La vainilla como aromatizante.
- Talco, silicato cálcico, como aglutinantes.
- Manitol, sorbitol, aspartato, sacarina entre otros como edulcorantes.

Según la proporción de los componentes tenemos las siguientes clases de chocolate.

- Chocolate negro: combinación de pasta de cacao con manteca de cacao o de la utilización exclusiva de la pasta de cacao con azúcar, existen varias combinaciones como:
 - Chocolate al 50%: contiene un 50% de pasta de cacao y 50% de azúcar (tiene sabor a café).
 - Chocolate al 70%: contiene un 70% de pasta de cacao y un 30% de azúcar (desaparece el gusto a café y tiene un sabor ácido).
 - Chocolate al 85%: contiene un 85% de pasta de cacao y 15% de azúcar (tiene un sabor muy ácido y áspero).
- Chocolate blanco: se utiliza exclusivamente la manteca de cacao, combinada con azúcar en polvo y leche.
- Chocolate con leche: contiene 35% de pasta de cacao combinado con leche en polvo o leche condensada, azúcar y vainilla.
- Chocolate en polvo: polvo de chocolate que se obtiene al extraer la grasa que contiene prensando la pasta de cacao. Contiene un 30% de cacao, azúcar y edulcorantes.
- Chocolate de cobertura: rico en manteca de cacao y contiene alrededor de un 32% de cacao.

IV.- 1 MÉTODOS DE ANÁLISIS

La determinación de teobromina y cafeína en suplementos alimenticios ha causado un gran interés debido a su gran consumo en la dieta y al efecto que estas metilxantinas pueden producir en combinación con otro tipo de sustancias (alcohol).

La cuantificación de estos analitos en los suplementos alimenticios se ha realizado principalmente por UPLC (cromatografía líquida de alta frecuencia) y por técnicas electroquímicas (voltamperometría, potenciometria y amperometría) que son muy accesibles y sensibles para la determinación de las metilxantinas, [Ao & Llu, 2005; Hasegawa et. all.,2009].

La técnica de UV-visible se ha utilizado para la detección de estos compuestos siendo muy sencilla de realizar, además de producir resultados confiables y reproducibles, [Días Nieves A., 2001].

IV.1.1 ESPECTROSCOPIA

La espectrofotometría de ultravioleta-visible es una técnica de medición de concentración de masa de elementos y compuestos químicos, cuyo principio es la interacción entre la energía electromagnética con la materia.

La absorción de radiación en la región UV, se puede usar con fines cuantitativos, ya que está relacionada con la concentración de las especies absorbentes de acuerdo con la ley de Lambert y Beer.

Se fundamenta en medir la radiación monocromática absorbida por un elemento ó molécula causante de transiciones electrónicas a capas superiores, estas transiciones determinan la región del espectro en la que tiene lugar la absorción.

Los grupos de átomos que dan origen a la absorción en el UV cercano o UV de cuarzo, se conocen como grupos cromóforos. La mayoría de los grupos insaturados y heteroatómicos que tienen pares de electrones no compartidos, son cromóforos potenciales y estos grupos son la base de la elucidación de grupos estructurales en las moléculas activas en el UV cercano.

La ley fundamental en la que se basan los métodos espectrofotométricos es la de Bouguer-Beer, Lambert y Beer y dice:

- a) La relación entre la intensidad de la luz transmitida o energía radiante I y la energía radiante incidente I_0 es una función del espesor de la celda a través del medio absorbente, de acuerdo a:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

donde:

A = absorbancia

b = espesor de la celda

a = absorptividad

c = concentración

La cantidad de energía electromagnética monocromática absorbida por un elemento es directamente proporcional a la concentración de la(s) especie(s) que absorbe(n) y a la longitud de la trayectoria de la muestra para un conjunto de condiciones instrumentales establecidas.

si $a = \log(I_0/I)$ donde:

entonces $T = (I/I_0)$ donde:

$$A = -\log T$$

$$A = -\log_{10} T = \log P_0 / P$$

donde:

P_0 y P es la cantidad de energía radiante que incide en el detector por unidad de superficie y por unidad de tiempo.

T = transmitancia

La absorción de energía da como resultado una excitación electrónica. La región del visible se extiende desde 350 a 800 nm. La región del ultravioleta abarca desde 100 a 350 nm y se divide en dos regiones diferentes; la región de ultravioleta lejano, que se extiende desde 100 a 200 nm y la llamada región del ultravioleta cercano que va desde 200 a 350 nm.

Los componentes principales de un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible son:

- Fuente de radiación energética estable.
- Monocromador para separar de la radiación policromática bandas de longitudes de onda o longitudes de onda.
- Compartimiento de muestra y/o referencia (blanco), transparente que les sirva de soporte.
- Detector de la energía transmitida.
- Sistema de Medida: de escala, digital o con registro gráfico

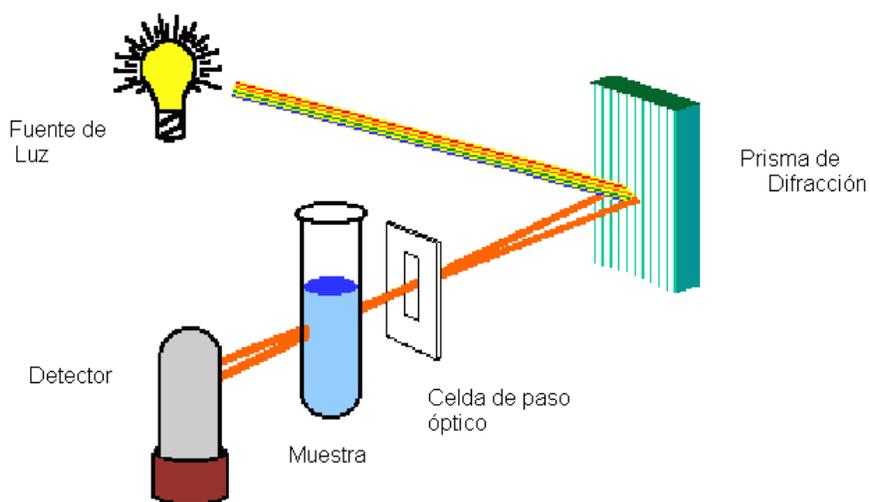


Fig. 2 Componentes del espectrofotómetro Ultravioleta-Visible

IV.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Se han desarrollado muchos métodos para la cuantificación de TB y CF destacando la cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas (LC-MS/MS), permitiendo el análisis de fluidos biológicos (saliva, plasma y orina), [Risner y Kiser, 2008].

En la actualidad se buscan métodos eficientes y económicos para la extracción de diferentes compuestos en matrices de alimentos. La revisión bibliográfica de las publicaciones recientes sobre diferentes métodos de extracción y su comparación con las extracciones asistidas por ultrasonidos indican que ésta

es más eficiente que los métodos de extracción tradicionales y más económica y sencilla que los métodos de extracción no tradicionales como la extracción asistida por microondas, por lo cual se comprueba su viabilidad industrial, [Rostango, et., all, 2003].

IV.2.1 EXTRACCIÓN MANUAL

Con la extracción manual se pueden extraer componentes solubles de sólidos con ayuda de un disolvente. Con este método siempre al término de la extracción la matriz contendrá una parte del analito además una parte del disolvente permanecerá también ligada en forma de adsorbato a ésta. La velocidad de extracción depende de los siguientes factores: temperatura, concentración del disolvente, tamaño de las partículas, porosidad y agitación. La importancia de la temperatura es que al aumentarla la eficiencia mejora porque la solubilidad es mayor. La reducción del tamaño de partículas aumenta el área superficial y disminuye el tiempo necesario para la extracción, sobre todo para sólidos con baja porosidad; que 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 provoca 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, [Fessenden, 1993].

IV.2.2 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS FOCALIZADOS

La utilización de los ultrasonidos no llegó a aplicarse en los laboratorios químicos hasta principios de los 70. La producción de ultrasonidos es posible gracias al descubrimiento de Marie y Pierre Curie en 1880 del efecto piezoeléctrico y su inversa.

Ultrasonidos es el nombre dado a cualquier onda de sonido cuya frecuencia sea superior a la frecuencia más alta que es capaz de captar el oído humano, esto es, de más de 16 kHz. Se pueden distinguir dos áreas de ultrasonidos, la de alta frecuencia (de 1 a 10MHz) y baja energía, y la de baja frecuencia (entre 20 y 100 kHz) y alta energía.

El ultrasonido puede dividirse según su aplicación en: ultrasonido de señal y de potencia. El ultrasonido de potencia (18 – 1000kHz) se considera una prometedora tecnología para la industria de procesamiento de alimentos, [Sonochemistry Centre, 2006]. Con una frecuencia más baja y mayor potencia producen cambios físicos y químicos en el medio a través de la generación y subsiguiente colapso de burbujas de cavitación, las cuales aparecen, crecen y

colapsan dentro del líquido. Esto ocurre asimétricamente cerca de las interfaces y la superficie sólida. Se requiere de un medio líquido, un generador de energía y un transductor, el cual convierte energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica, (Mulet et al., 2003).

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia con el fin de desprender el compuesto buscado del material. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente, [Ao & Liu, 2005]. Según Rostagno y colaboradores, esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas, [Rostagno et, all. 2003].

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectados por la sonicación, ya sea que las sustancias de interés se encuentren en células internas o externas del tejido. Al reducir el tamaño de partículas del material se aumenta el área de exposición al solvente y la cavitación producida.

Los ultrasonidos ejercen su efecto a través de lo que se conoce como burbujas de cavitación. Éstas se forman en el ciclo de depresión de la onda, cuando la estructura del líquido literalmente se abre, por la presión negativa, para formar burbujas microscópicas. En el siguiente ciclo de compresión, las burbujas se ven obligadas a contraerse y, en consecuencia, implotan.

La ruptura de las burbujas de cavitación puede generar presiones de cientos de atmósferas y temperaturas de miles de grados centígrados en micropuntos del medio, dando lugar a ondas de choque que se dispersan por el medio de reacción.

Los aparatos comerciales más comunes de ultrasonido son el baño de limpieza y la sonda ultrasónica. El baño presenta las ventajas de ser la fuente de irradiación económicamente más asequible, al tiempo que asegura una sencilla distribución de la energía en el reactor que se coloque en el baño. La sonda destaca por su mayor potencia, y por el hecho de que ésta sea variable.

Son muchos los procesos químicos susceptibles de ser modificados por radiación ultrasónica. Los efectos más significativos de la aplicación de ultrasonidos son: aumentos en la velocidad de reacción, dulcificación de las condiciones experimentales y/o aumentos de rendimientos.

La irradiación ultrasónica ya no constituye una técnica aislada sino que se ha convertido en una técnica habitual en los laboratorios, no sólo para síntesis, [D. Ghosh y D. E. Nichols. 1996]. De hecho, una de las mayores aplicaciones de los

ultrasonidos es la extracción, tanto de compuestos orgánicos como de inorgánicos, de diversos tipos de muestras.

IV.2.3 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS FOCALIZADOS

Consiste en el calentamiento del extractante (en general un disolvente orgánico) en contacto con la muestra, haciendo uso de la energía de microondas [J.R.J. Pare y D.E.Nichols, 1995]. Las microondas calientan la muestra sin necesidad de calentar el vaso reactor, así es posible alcanzar con rapidez el punto de ebullición, disminuyendo el tiempo de extracción.

Las microondas son una radiación no-ionizante (frecuencia de 300 a 300000MHz) que provoca movimientos moleculares por migración de iones y rotación de dipolo.

La aplicación de la energía de microondas puede llevarse a cabo por medio de dos tecnologías: con vasos cerrados (controlando presión y temperatura), o vasos abiertos (a presión atmosférica), [M. Letellier, 1999; C. Demesmay, 1993].

- Vasos cerrados: El disolvente se puede calentar por encima de su temperatura de ebullición a presión atmosférica, con lo que se consigue una alta velocidad extractiva y eficacia. Se pueden extraer distintas muestras en distintos vasos reactores simultáneamente.
- Vasos abiertos: Trabaja a presión atmosférica. La energía de microondas se focaliza, por lo que el calentamiento es homogéneo y muy eficiente.

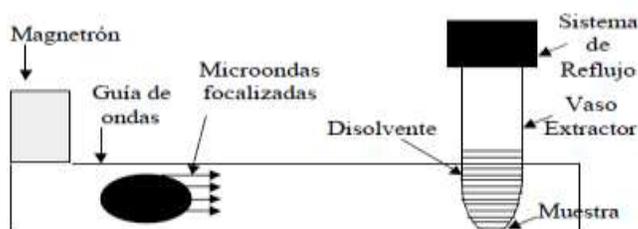


Fig.3 Distintos tipos de sistemas de aplicación de microondas

Las aplicaciones de EAM se centran fundamentalmente en la extracción de compuestos orgánicos de matrices sólidas, [K.K.Chee. et, all., 1996; Camber, 1997].

Para estas matrices sólidas, la extracción de HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) resulta satisfactoria, utilizando vasos abiertos, con diclorometano, durante 10 minutos a una potencia de 30W, [V.López-Ávila y J. Benedicto, 1996; H. Budzinski, et. all., 1995]. Y para vasos cerrados, se ha utilizado disolventes como diclorometano, acetona y mezclas acetona-hexano, [J.R Deam, et. all., 1997; I.J.Barnabas, et. all., 1995].

Las aplicaciones desarrolladas por EAM muestran que la extracción se presenta como una alternativa viable a las técnicas convencionales, además permite conseguir una gran reducción del tiempo de análisis y del consumo de disolventes, además de poseer la capacidad de realizar extracciones múltiples obteniendo reproducibilidades aceptables

V. METODOLOGÍA

V.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Para las extracciones se utilizaron los siguientes reactivos y disoluciones:

Bicarbonato de sodio	J.T Baker
Éter de Petróleo	Mallincroadt
Cloroformo	Mallincroadt

Reactivo de Carrez I

Se pesaron 24g de acetato de zinc (Baker) y disolvieron en 50ml de agua destilada; se agregaron 3ml de ácido acético (Baker) y se aforó a 100ml de agua destilada.

Disolución de NaOH (2M)

Se pesaron 8g de NaOH (Baker) y se llevó a un aforo de 100ml con agua destilada.

Para la cuantificación de teobromina y cafeína se preparó lo siguiente:

Disolución Madre de Teobromina

Se pesaron 52.9 mg de Teobromina (Fluka) con un grado de pureza del 98%, se trasvaso a un matraz aforado de 100 mL y se llevó al aforo con agua destilada. A partir de ésta se prepararon 5 estándares entre 1 µg/mL y 20 µg/mL.

Disolución Madre de Cafeína

Se pesaron 1.3mg de cafeína (Sigma) con un grado de pureza mayor al 99% se trasvaso a un matraz aforado de 100 mL y se llevó al aforo con agua destilada. A partir de esta se prepararon 5 estándares entre 1 µg/mL y 20 µg/mL.

V.2 INSTRUMENTOS Y APARATOS

- Ultrasonido (con punta de titanio de 12 mm de diámetro) BRANSON ULTRASONICS CORP. SONIFIERS 250/450
- Potenciómetro OAKTON pH 500 series Modelo 00702-75
- Parrilla de calentamiento CIMAREC Modelo sp46925
- Espectrofotómetro VARIAN Cary 3 UV
- Centrifuga Hettich Modelo EBA20
- Horno de secado RIOS ROCHA Modelo E41
- Balanza Analítica OHAUS Modelo E12140

V.3 MUESTRAS

- 1.-Grano de cacao, proveniente de Comacalco, Tabasco, (muestra sólida).
- 2.-Cocoa comercial en polvo Hershey's. (muestra sólida)
- 3.- Chocolate amargo Lindt Excellence 70% de cocoa, (muestra sólida).
- 4.- Chocolate amargo Lindt Excellence 85% decocoa, (muestra sólida).
- 5.- Chocolate amargo Lindt Excellence 90% decocoa, (muestra sólida).
- 6.- Chocolate semiamargo Hershey's 42% de cacao, (muestra sólida).
- 7.-Chocolate amargo Turín, (muestra sólida).
- 8.-Chocolate suave con leche World Table, (muestra sólida).
- 9.-Chocolate sin azúcar ChocoZero, (muestra sólida).
- 10.-Chocolate (abuelita), (muestra sólida).
- 11.-Bebida de leche con chocolate Hershey's, (muestra líquida).
- 12.-Jarabe sabor a chocolate Great Value, (muestra líquida).
- 13.- Chocolate con leche (Carlos V), (muestra sólida).
14. Cascarilla, (muestra sólida).

V.4 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de grano fueron compradas en el mercado de la Merced; procedentes de Comacalco Tabasco, se trata de dos muestras compradas en el mismo mercado pero en diferentes establecimientos; se dividieron en dos lotes debido a que presentaban la característica visual de tener diferente humedad. El lote 1 pertenece a aquellos granos que se observan más secos a diferencia del Lote 2. También se realizaron pruebas tanto en cascarilla como en cocoa comercial Hershey's.

Para el análisis de las primeras muestras a partir del grano, estos se descascarillaron previamente para después molerse finamente hasta obtener un polvo homogéneo, el mismo procedimiento de molido se usó para la cascarilla del grano, para los posteriores análisis se incluyó una etapa de desengrasado. El análisis en cocoa comercial no requirió ningún tratamiento previo.

En el caso de los chocolates sólidos, se desengrasaron previamente como se indica más adelante y para el caso de las muestras líquidas solo se realizó una dilución en agua debido a la viscosidad que presentaban.

V.5 HUMEDAD

Se realizó la prueba de contenido de humedad solo en el grano de cacao de ambos lotes, de acuerdo a la NMX-F-268-1976. Para ello se pesaron 10g de grano de cacao molido para después colocar en un horno de secado a una temperatura de $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un período de 16 horas.

V.6 DETERMINACIÓN DE GRASA

Se utilizaron 3 extracciones de 5mL de éter de petróleo, posteriormente se separó la parte insoluble (cocoa) centrifugando a 2500 rpm durante 2 minutos, el éter de petróleo se evaporó con un flujo de nitrógeno y para cuantificar el porcentaje de grasa se pesó el grano antes de desengrasar y después del tratamiento.

V.7 REMOCIÓN DE GRASA

Para desengrasar tanto al grano de cacao como las muestras de chocolate sólido, se utilizaron tres extracciones de 5ml de éter de petróleo, posteriormente se separó la parte sólida centrifugando a 2500rpm durante 2 min., se separaron las fases y el exceso de éter de petróleo se evaporó con un flujo de nitrógeno.

V.8 FORTIFICACIÓN

Se tomó en cuenta la concentración tanto de cafeína como de teobromina en las muestras de cocoa y chocolates. Se prepararon dos disoluciones de concentración: 2.16 µg/mL para CF y 2.048 µg/mL para TB, se añadieron las alícuotas adecuadas a las muestras para que al ser analizadas las concentraciones de éstas se encontraran dentro de las respectivas curvas de calibración.

V.9 MÉTODO DE EXTRACCIÓN MANUAL, [Fessenden, 1993].

Se pesó un gramo de muestra (grano de cacao descascarillado y molido, chocolate sólido, cocoa en polvo y cáscara de grano) a la cual se le añadió 100ml de agua destilada a 80°C, se dejó agitando durante 5 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 5ml del reactivo Carrez I. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se filtró, posteriormente se agregó bicarbonato de sodio (entre 3-5g) hasta la formación de un precipitado y se filtró. Todo el recuperado del filtrado se aforó a 100ml con agua destilada. De éste se tomaron 50ml y se ajustó el pH con NaOH 2M entre: 12.5 y 12.7; se colocó en un embudo de separación y se le agregaron 25ml de cloroformo divididos en dos porciones de 15 y 10 ml para extraer la cafeína (agitando vigorosamente), recordando que la fase orgánica contiene a la cafeína y a la fase acuosa contiene a la teobromina, [Fessenden, 1993].

Para la cuantificación de cafeína se tomó 1ml de la fase orgánica y se aforó a 10ml de cloroformo, para teobromina se tomó 1ml de la fase acuosa y se aforó a 25ml con agua destilada. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 275.9 y 272.7nm respectivamente, [González, 2010].

V.10 MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR MICROONDAS, [M. Letellier, 1999; C. Demesmay, 1993].

Se peso 1 gramo de muestra (grano de cacao descascarillado y molido, chocolate sólido, cocoa en polvo y cáscara de grano), y se transfirió a un tubo colector de microondas adicionándole 90mL de agua destilada a 80°C y 5mL de reactivo de Carrez I.

Se establecieron las condiciones del equipo: (potencia 200W, tiempo de irradiación 5min. y volumen del extractante 95mL). Después de la extracción se enfrió y se filtró, para después adicionar NaHCO₃ hasta la formación de un precipitado. El filtrado se aforó a 100mL con agua destilada. Se tomaron 10mL en un vaso de precipitados y se le adicionó NaOH 2M para ajustar el pH entre 12.5 -

12.7; se agregaron 10mL de cloroformo y se utilizó la sonda de ultrasonidos a: 40% (160 W) de potencia durante 30 segundos para extraer la cafeína. Se traspasó a tubos de ensaye y se centrifugó durante 10min a 6000rpm.

Se separaron las fases recordando que la fase orgánica contiene a la cafeína y la fase acuosa contiene a la teobromina, [Sonochemistry Centre, 2006; Mulet et al., Ao & Liu, 2005; Rostagno, et al., 2003].

Posteriormente se tomó 1mL de la fase orgánica y se aforó a 10mL con cloroformo para cuantificar cafeína y se tomó 1mL de la fase acuosa y se aforó a 25mL con agua destilada para teobromina. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 275.9 y 272.7nm respectivamente.

V.11 MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR ULTRASONIDOS FOCALIZADAS (Método Propuesto)

Se pesó un gramo de muestra, se le agregaron 100mL de agua destilada a 80°C y se sónico con la sonda del ultrasonido con las siguientes condiciones de trabajo: 60% (240 W) de potencia durante 180 segundos (la punta de titanio de la sonda quedó justo a la mitad de la disolución). Una vez terminada la sonicación se agregaron 5mL del reactivo Carrez I. Se dejó enfriar y se filtró, se le agregó bicarbonato de sodio (3-5g) hasta la formación de un precipitado y se volvió a filtrar. Todo el filtrado se aforó a 100mL con agua destilada. Se tomaron 10mL y se ajustó el pH entre 12.5 y 12.7 con NaOH 2M; se agregaron 10ml de cloroformo y se utilizó la sonda de ultrasonidos a: 40% (160 W) de potencia durante 30 segundos para extraer la cafeína. Se traspasó a tubos de ensaye y se centrifugó durante 10min a 6000rpm.

Se separaron las fases recordando que la fase orgánica contiene a la cafeína y la fase acuosa contiene a la teobromina, [Sonochemistry Centre, 2006; Mulet et al., Ao & Liu, 2005; Rostagno, et al., 2003].

Posteriormente se tomó 1mL de la fase orgánica y se aforó a 10mL con cloroformo para cuantificar cafeína y se tomó 1mL de la fase acuosa y se aforó a 25mL con agua destilada para teobromina. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 275.9 y 272.7nm respectivamente.

V.12 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Para los métodos de extracción manual y extracción por ultrasonidos focalizados se llevó a cabo la extracción de cafeína y teobromina en cocoa en polvo comercial durante siete días consecutivos por duplicado bajo las mismas condiciones de trabajo, el mismo analista, en los mismos equipos y pesadas independientes.

Se calculó la repetibilidad relativa dentro de los días de estudio (Sr_2) y la reproducibilidad relativa entre días (S_{WR2}), donde se elaboró un estudio de ANOVA de variación entre días y dentro de los días de análisis para cafeína y teobromina respectivamente, [Miller, 2002].

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA MÁXIMA DE ABSORCIÓN PARA TEOBROMINA Y CAFEÍNA.

De acuerdo a datos tomados de la literatura, se selecciono el intervalo de 190nm a 350nm, [González, 2010].

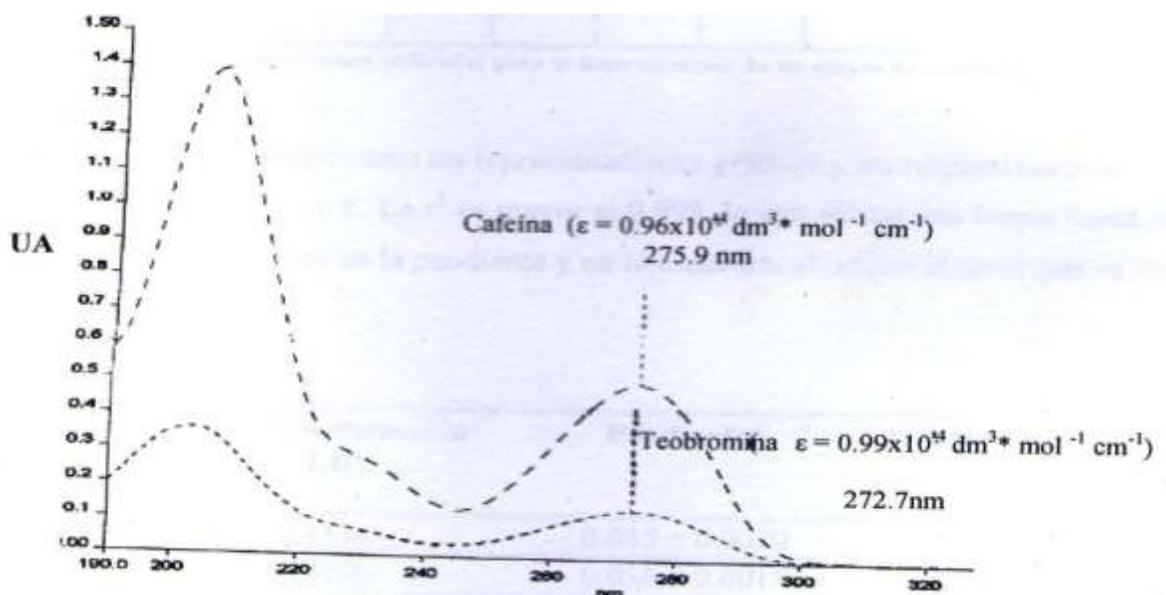


Fig. 4. Espectros de absorción de ambos analitos.

En el espectro de absorción de ambos analitos se aprecia que de 272.7nm y 275.9nm son las longitudes de onda a las que TB y CF presentan mayor absorbancia. Además de observar en el espectro solapamiento, demostrando la interferencia de la cafeína al medir la teobromina de las muestras.

VI.2 ELABORACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se realizó una curva de calibración con una concentración de 25ppm.

Cálculos realizados:

$$(25\mu\text{g/mL})(50 \text{ mL}) = 1250\mu\text{g} = 1.25\text{mg}$$

Para obtener la siguiente concentración: 1 µg/mL

Se toma 1mL de la solución madre y se afora a 25 mL con cafeína. Se realiza de la misma forma para las otras concentraciones.

1mL ---- 25mL aforo

Para 3µg/mL

3mL-----25mL aforo

Para 5µg/mL

5mL----25mL aforo

Para 10µg/mL

10mL----25mL aforo

Para 20µg/mL

20 mL-----25mL aforo

Se pesó 1.3 mg de cafeína en un vaso de precipitados de 50mL, los cuales se disolvieron con 25mL de cloroformo, se trasvaso a un matraz volumétrico de 50mL, el cual se aforo con cloroformo. En la Tabla 1, se muestran las concentraciones de las disoluciones estándar utilizadas para la elaboración de las curvas de calibración.

Concentraciones en soluciones µg/mL					
Teobromina	1µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20µg/mL
Cafeína	1µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20µg/mL

Tabla 1. Concentraciones utilizadas para la elaboración de las curvas de calibración.

En la Tabla 2 y 3, se muestran las absorbancias encontradas con su respectiva concentración para la elaboración de las curvas de calibración de cafeína y teobromina.

COCENTRACIÓN (µg/mL)	CAFEÍNA (CF)		
	ABSORBANCIA		
1	0.0394	0.0490	0.0343
3	0.1490	0.1349	0.0343
5	0.2260	0.2362	0.1420
10	0.4910	0.4794	0.2280
20	0.9760	0.9796	0.9746

Tabla 2. Concentraciones de cafeína para la elaboración de la curva de la calibración.

Para el caso de teobromina se propuso una solución madre de 50ppm.

Cálculos realizados:

$$(50\mu\text{g/mL})(100\text{ mL}) = 5000\mu\text{g} = 5\text{mg}$$

Para obtener la siguiente concentración: 1 $\mu\text{g/mL}$

Se toma 1mL de la solución madre y se afora a 50 mL con cafeína. Se realiza de la misma forma para las otras concentraciones.

1mL ---- 50mL aforo

Para 3 $\mu\text{g/mL}$

3mL-----50mL aforo

Para 5 $\mu\text{g/mL}$

5mL-----50mL aforo

Para 10 $\mu\text{g/mL}$

10mL-----50mL aforo

Para 20 $\mu\text{g/mL}$

20 mL-----50mL aforo

Se pesó 0.0050g de teobromina en un vaso de precipitados de 50mL, los cuales se disolvieron con 50mL de agua destilada, se trasvaso a un matraz volumétrico de 100mL, el cual se afora con agua destilada.

TEOBROMINA (TB)			
CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	ABSORBANCIA		
1	0.0784	0.0785	0.0784
3	0.1974	0.1986	0.1970
5	0.3150	0.3151	0.3149
10	0.6132	0.6135	0.6140
20	1.2140	1.2142	1.2140

Tabla 3. Concentraciones de teobromina para la elaboración de la curva de la calibración.

En la gráfica 1 se muestra la curva de calibración para cafeína y en la gráfica 2 la de teobromina. En la Tabla 5 se muestran las características de los métodos.

Ecuación de la línea recta:

$$y = mx + b$$

donde:

y= Variable Dependiente

x= Variable independiente

m= Pendiente

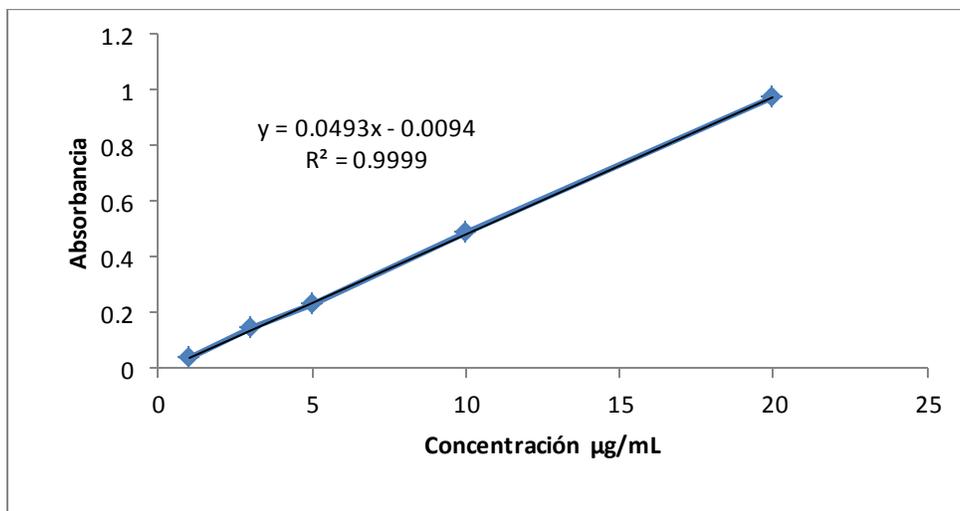
b= Ordenada a origen

Ejemplo:

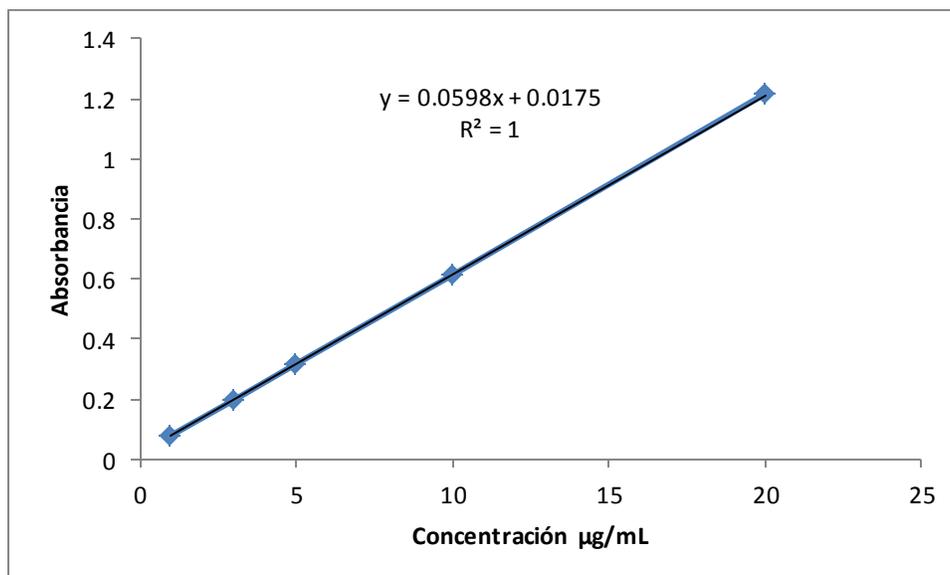
Para el caso de cafeína: En la siguiente tabla se observa la relación de concentración y absorbancia (promedio de las 3 repeticiones elaboradas y escritas en la tabla 3).

COCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	ABSORBANCIA
1	0.0409
3	0.1061
5	0.2014
10	0.3995
20	0.9767

Tabla 4. Relación de concentración y absorbancia para cafeína.



Gráfica 1. Curva de Calibración de Cafeína.



Gráfica 2. Curva de calibración de Teobromina.

Compuesto	Limite de detección (LD)	Pendiente	Intervalo Líneal (µg/mL)	Ordenada al origen
Cafeína	0.3058	0.0493±0.0010	1-20	0.0094±0.0109
Teobromina	0.0808	0.0598±0.0003	1-20	0.0175±0.0035

Tabla 5. Características del método. Los cálculos en los errores de la pendiente y ordenada, así como el (LD) se hicieron a un nivel de confianza del 95%.

VI.3 DETERMINACIÓN DE LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección es aquella concentración de analito que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de ruido de fondo o señal de un blanco. Concentración de analito más baja presente en una muestra que puede ser detectable, pero no necesariamente cuantificable en las condiciones de trabajo, [Morante, 2007].

A continuación se muestra un ejemplo para la cafeína del cálculo de límite de detección y errores en la ordenada al origen y pendiente, [Montgomery, Douglas, C. 2010].

Ecuación: $y = 0.00493 - 0.0094x$

$$\sum X_i^2 = 535 \quad \sum (y_i - \hat{y})^2 = 0.000076 \quad \bar{X} = 7.8 \quad \sum (X_i - \bar{X})^2 = 230.8$$

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

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{3}} = 0.0050$$

$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$ Desviación estándar de la pendiente.

$$S_b = \frac{0.0050}{\sqrt{230.8}} = 0.00033$$

N= Número de muestras.

n= 3 el valor de t al 95% es de 3.18

De acuerdo a la ecuación: $y = 0.00493 - 0.0094x$

Para la pendiente:

$$\underline{b = 0.0493 \pm 0.00105}$$

Para la ordenada al origen:

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

$$S_a = (0.0050) \sqrt{\frac{535}{1154}} = 0.0034$$

$$\underline{a = -0.0094 \pm 0.01088}$$

Límite de Detección:

$$LD = y_b + 3s_b$$

$$y_B (= a) \quad S_B (= S_{x/y})$$

$$-0.0094 + 3(0.0050) = 0.0057$$

$$\frac{0.0057 + 0.0094}{0.0493} = \underline{0.3058 \text{ } \mu\text{g/mL}}$$

VII. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDO POR ULTRASONIDOS FOCALIZADOS.

VII.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA Y TEOBROMINA

La optimización de este proceso se llevó a cabo mediante un diseño factorial de 2^3 con el fin de optimizar y establecer los parámetros óptimos de extracción de cafeína y teobromina. El propósito principal fue extraer la mayor cantidad de teobromina y cafeína, por lo que se propuso un diseño de experimentos de 3 factores de entrada, estos corresponden a los parámetros: potencia, tiempo de irradiación y volumen del disolvente y una variable de salida, que es la absorbancia o concentración calculada.

Se eligieron tres puntos centrales con el fin de determinar precisión del método vía un análisis de varianza. Para este estudio se utilizó cocoa en polvo comercial.

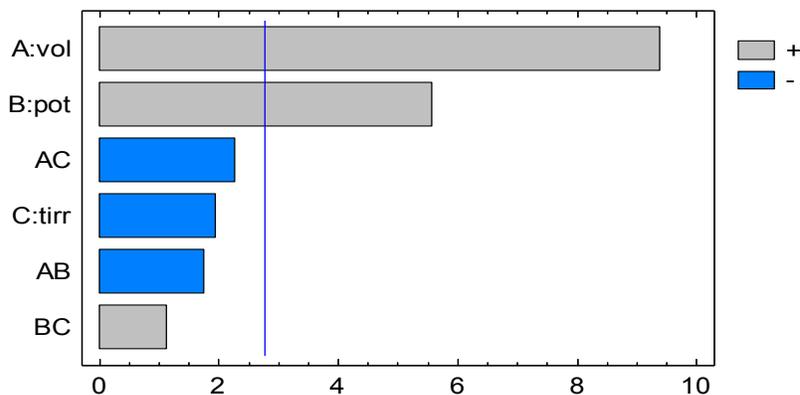
Los valores mínimos y máximos para cada parámetro se establecieron de acuerdo a ensayos realizados previamente. Para el caso del volumen se eligió un valor máximo de 70mL y un mínimo de 25mL (tomando en cuenta la adición del reactivo de Carrez I), basándonos en evaluar una disminución de la cantidad del volumen de extracción. Persiguiendo el mismo propósito, para el tiempo de extracción se propuso un tiempo de irradiación de 30 segundos como mínimo y un máximo de 180 segundos. Se determinó que la potencia se usaría a un mínimo de 10% ya que se verificó que a potencias menores del 10%, la cantidad de cafeína extraída era mínima, notándose un aumento considerable a partir del 10%.

Para no usar extremos de la potencia y tratar de minimizar las condiciones de trabajo se estableció como máximo un 30% de potencia, (Tabla 2).

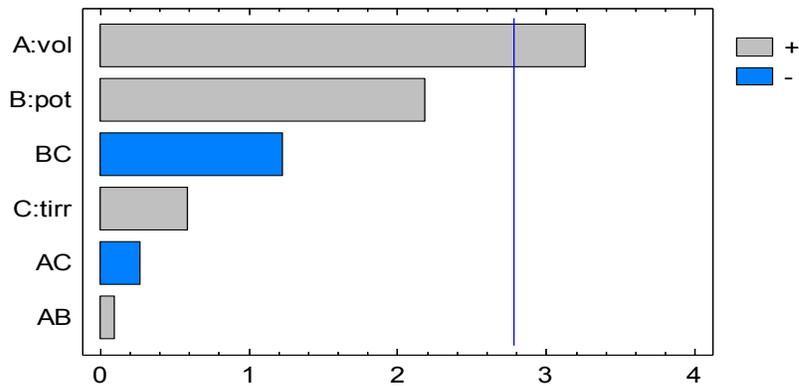
No. De Ensayo	VOLUMEN (ml)	POTENCIA (%)	t. irradiación (seg)	mg CF/gmuestra	mg TB/gmuestra
1	25	30	180	0.62	10.99
2	47.5	20	105	0.75	13.61
3	70	10	180	0.64	13.84
4	70	30	30	1.03	16.59
5	47.5	20	105	0.75	15.63
6	25	10	30	0.25	6.86
7	25	10	180	0.25	11.94
8	25	30	30	0.59	13.65
9	70	30	180	0.92	17.46
10	70	10	30	0.94	13.81
11	47.5	20	105	0.71	14.46

Tabla 6. Diseño factorial para cafeína y teobromina para el método de extracción asistido por ultrasonidos focalizados.

En los gráficos 3 y 4 se muestran los diagramas de pareto para cafeína y teobromina respectivamente a partir de los resultados obtenidos con el Diseño de la tabla 2, [Statgraphics, 1992].



Gráfica3. Diagrama de Pareto para cafeína con el diseño 2^3 , (Tabla2).



Gráfica 4. Diagrama de Pareto para teobromina con el diseño 2^3 , (Tabla 2).

A: Volumen

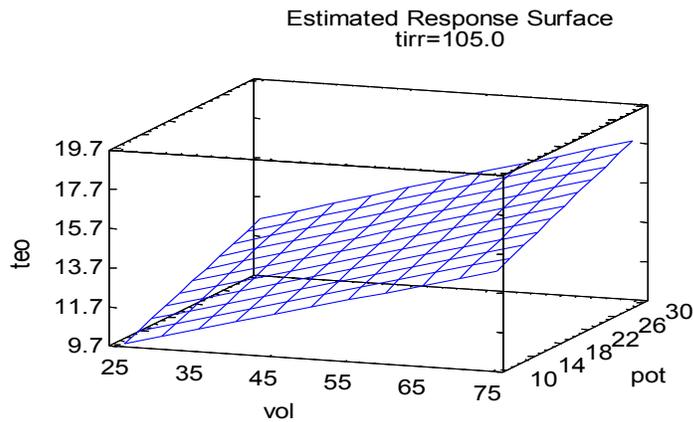
B: Potencia

C: Tiempo de irradiación

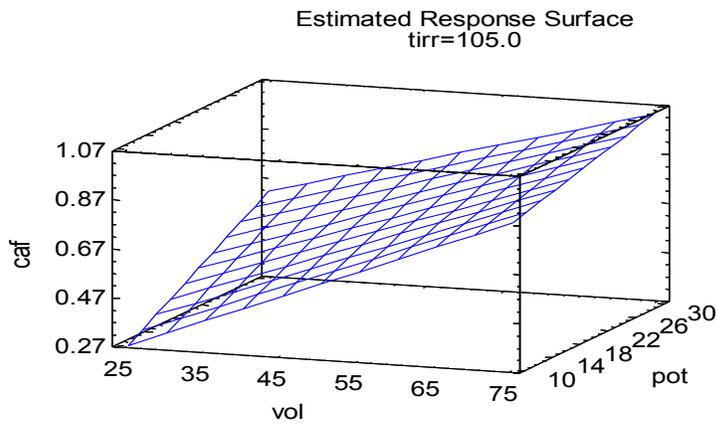
Evaluando los efectos de los factores sobre cada analito (teobromina y cafeína), es posible distinguir los factores influyentes sobre la extracción y con ello concluir que los factores: volumen de disolvente de extracción y potencia presentaron un impacto significativo en la extracción de cafeína aunque no en igual medida, siendo más importante el volumen. Para teobromina el factor que más influye es el volumen, pero un aumento en la potencia favorece la extracción aunque no es un factor clave.

También fue posible determinar que cuando aumenta el tiempo de irradiación aumenta la cantidad de teobromina y cafeína extraída cuando la potencia es baja (experimentos 2 y 5).

En los gráficos 5 y 6 se muestra que al aumentar el volumen de disolvente y la potencia se obtendrá una mejor extracción de los analitos.



Gráfica5. Superficie de respuesta para teobromina en el diseño 2^3 (Tabla 2) para volumen y potencia.



Gráfica6. Gráfico de superficie de respuesta para cafeína en el diseño 2^3 (Tabla 2) para volumen y potencia.

Con este diseño experimental las condiciones óptimas para llevar a cabo la extracción de cafeína y teobromina fueron: un volumen de 70mL, potencia de 30% y tiempo de irradiación de 180 segundos.

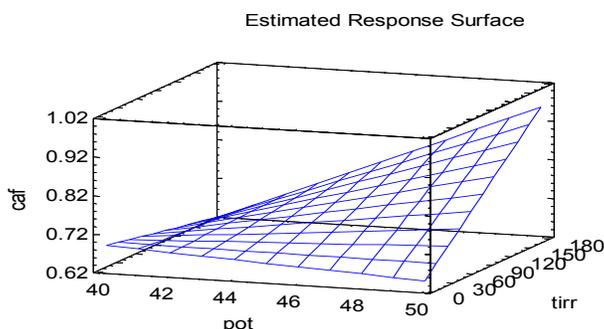
Para observar mejor el efecto que ejerce sobre la extracción la potencia y el tiempo de irradiación se propuso un segundo diseño de experimentos 2^2 con tres puntos centrales, donde se mantuvo el volumen como una constante, a 25 mL para economizar el volumen del disolvente de extracción y se estudió la potencia a 40% (160 W) como mínimo y 50% (200 W) como máximo y un tiempo de irradiación de 30 y 180 segundos.

En la Tabla 3 se muestran los experimentos realizados y las concentraciones encontradas para cada uno.

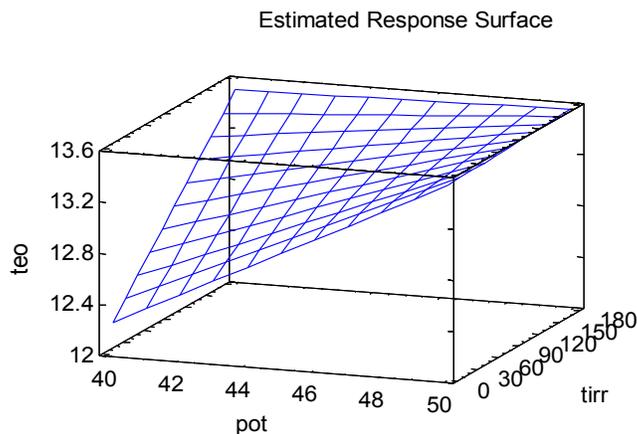
Número de Ensayo	POTENCIA (%)	t. irradiación (seg)	mg CF/gmuestra	mg TB/gmuestra
1	45	105	1.062	18.15
2	40	30	0.64	17.69
3	45	105	1.1099	17.23
4	50	180	2.02	20.59
5	45	105	1.22	17.49
6	40	180	0.69	19.662
7	50	30	1.13	19.04

Tabla 7. Diseño experimental para determinar la influencia de potencia y tiempo de irradiación en la extracción de Cafeína (CF) y Teobromina (TB).

En el gráfico 7 se muestra que conforme aumentemos el tiempo de irradiación y la potencia incrementará la extracción de cafeína. Mientras que para la teobromina la extracción solo se mejorará al aumentar la potencia (Gráfico 8).



Gráfica 7. Gráfico de superficie de respuesta para cafeína en el estudio entre la potencia y el tiempo de irradiación (segundo diseño 2^2), (Tabla3).



Gráfica 8. Gráfico de superficie de respuesta para teobromina en el estudio entre la potencia y el tiempo de irradiación (segundo diseño 2^3), (Tabla 3).

Por otra parte como a mayor volumen se favorece la extracción de ambos analitos, se propuso aumentar el volumen a 100ml que es el que se usa en el método de extracción manual, se aumentó la potencia hasta el máximo de 60% (máxima potencia que se puede usar con la sonda utilizada) y se irradió a 180 segundos.

En la Tabla 4 se muestran los resultados que se obtuvieron al utilizar las condiciones indicadas en el párrafo anterior.

Volumen (mL)	Tiempo de Irradiación (seg)	Potencia (%)	(mg CF/g muestra)	(mg TB/g muestra)
100	180	60	2.10	19.78
100	180	60	2.09	19.83
100	180	60	1.87	18.98

Tabla 8. Concentración de TB y CF en cacao en polvo por ultrasonidos focalizados.

Como se observa, la extracción de ambos analitos aumentó. Para poder tomar estos parámetros como óptimos se propuso incrementar el tiempo de irradiación para observar si aumentaba la extracción. También se tomó en cuenta la adición del reactivo de Carrez I antes y después de sonicar.

Para el caso del tiempo de irradiación, se propuso efectuar la extracción en tiempos de 300 segundos y 600 segundos, pero se observó que los resultados obtenidos eran similares a los obtenidos a 180 segundos. Datos que se pueden apreciar en el gráfico 9.

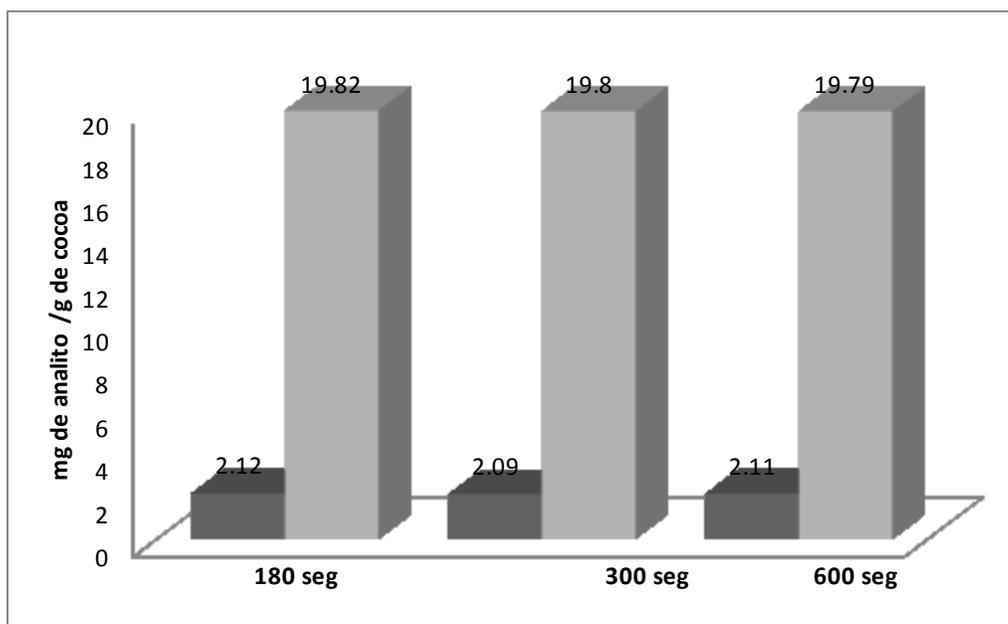


Gráfico 9. Concentración de CF y TB aumentando el tiempo de extracción.

Como se obtuvieron valores muy similares, las condiciones óptimas para la extracción de cafeína y teobromina por el método de extracción asistida por ultrasonidos focalizados, fueron:

FACTOR	ÓPTIMO
Potencia	60
Tiempo de Irradiación (seg)	180
Volumen de Disolvente (ml)	100

Tabla 9. Condiciones óptimas de trabajo para la extracción de teobromina y cafeína con ultrasonidos focalizados.

También se tomó en cuenta la adición del reactivo Carrez I antes y después de sonicar, llegando al resultado de que la extracción de ambos analitos mejora cuando se adiciona después de la sonicación.

Reactivo de Carrez I	mg CF / g muestra	mg TB /g muestra
ANTES DE LA EXTRACCIÓN	2.087±0.0005	19.53±0.455
DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN	2.177±0.0005	19.617±0.249

Tabla 10. Concentración de teobromina (TB) y cafeína (CF) obtenidos en la extracción asistida por ultrasonidos focalizados, agregando el reactivo Carrez I, antes y después de la extracción en cocoa en polvo.

VII.2 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE CAFEINA DEL EXTRACTO ACUOSO

La optimización de este proceso se hizo simultáneamente para la extracción de CF y TB de las muestras de cocoa. Por el método oficial, la extracción de cafeína en medio acuoso con cloroformo se realiza de manera múltiple, es decir se toma una porción de cloroformo y se divide en varias porciones iguales para hacer extracciones sucesivas utilizando un embudo de separación, éste se coloca en un soporte por medio de pinzas de tres dedos, se agrega la solución y en seguida el disolvente, se cierra con el tapón y se agita moderadamente. Disminuyendo la presión interna del mismo después de cada agitación.

Se deja reposar en posición vertical hasta la separación de fases y se recibe las fases orgánicas y acuosas de la extracción por separado [Fessenden and Fessenden; Moore; Dalrymple, 1976].

Se hizo un estudio para extraer cafeína de los extractos acuosos usando cloroformo y llevando a cabo la extracción con ultrasonidos con el objetivo de disminuir la cantidad de cloroformo, tiempo de extracción y evitar el uso de embudos de separación, como se indica en la metodología anterior. Se evaluaron dos volúmenes: 25 y 50ml de cloroformo, a una potencia de 30 y 40% y un tiempo de irradiación mínimo de 30 segundos y un máximo de 50 segundos. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos.

Volumen (mL)	Potencia (%)	Tiempo de irradiación (seg)	mg CF/g cocoa	mg TB/g cocoa
25	30	50	2.18	19.77
25	40	30	2.21	19.89
50	30	50	2.19	19.85
50	40	30	2.21	19.82

Tabla10. Concentración de CF y TB obtenidos para la optimización de la extracción de cafeína de medio acuoso con cloroformo.

Se observó que aunque se aumente el volumen, el tiempo de irradiación o la potencia, los valores son muy similares, pero eran mayores para una potencia de 40%, por lo que se realizaron otros ensayos donde se incrementó la potencia, pero como no se encontró concentraciones de analitos superiores a las ya obtenidas a una potencia de 40%, se decidió usar esta potencia como parámetro óptimo en la extracción.

Con respecto al tiempo de irradiación y al volumen de cloroformo se llevaron a cabo otros experimentos donde se redujeron ambos factores, pretendiendo utilizar menos cantidad de volumen y un tiempo mínimo de extracción. Se encontró que con un tiempo de irradiación de 30 segundos se da un aumento significativo en la extracción de cafeína, no así usando tiempos mayores. A tiempos menores la cantidad extraída fue menor, por lo que se estableció como valor óptimo 30 segundos.

En cuanto al volumen de extracción, se encontró que se puede utilizar 10ml de cloroformo y tener como resultado las mismas concentraciones de cafeína obtenidas con un volumen de 25ml, al igual se realizaron pruebas con volúmenes menores, las cuales se descartaron debido a que la concentración de analitos se veían disminuidas significativamente, además de que con volúmenes menores de cloroformo, la sonda no se cubría lo suficiente para poder llevar a cabo la sonicación de manera uniforme, por lo que el volumen de 20ml de cloroformo se estableció como valor óptimo para la extracción de cafeína.

Por lo tanto las condiciones óptimas de extracción de cafeína con cloroformo de la fase acuosa fueron:

FACTOR	ÓPTIMO
Potencia	40
Tiempo de Irradiación (seg.)	30
Volumen de Disolvente (ml)	10

Tabla 11. Condiciones óptimas de trabajo para la extracción de cafeína en medio acuoso con cloroformo.

VIII. APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS A ESTÁNDARES

Se analizaron disoluciones estándar de TB y CF con el objetivo de verificar que los ultrasonidos no afectan a los analitos, bajo las condiciones encontradas en la tabla 9 y 11. En las Tablas 12 y 13 se observa que el porcentaje de recuperación tanto para cafeína como para teobromina están cerca del 100%, por lo tanto el uso de ultrasonido no altera la estructura de ambos analitos.

La elaboración de estándares se realizó de la siguiente manera:

Estándar de cafeína (CF)

Se tomó 0.5mg de cafeína en un vaso de precipitados de 50mL, para disolver se agregaron 50mL de cloroformo, posteriormente se trasvaso a un matraz volumétrico de 100mL llevándolo al aforo con cloroformo.

Estándar de teobromina (TB)

Se tomó 1 mg de teobromina en un vaso de precipitados de 50mL, para disolver se agregaron 50 mL de agua destilada, posteriormente se trasvaso a un matraz volumétrico de 100mL llevándolo al aforo con agua destilada.

Ejemplo de cálculo de porcentaje de recuperación a partir de la absorbancia encontrada en las muestras:

En el caso de cafeína; Se obtiene una absorbancia de 0.2415, usando la ecuación:

$$y = 0.093x - 0.0094$$

$$0.2415 = 0.0093x - 0.0094$$

$$x = (0.2415 + 0.0094) / 0.0093$$

$$x = 5.089 \mu\text{g/mL}$$

Si la concentración del estándar es 5µg/mL que equivale al 100%, 5.089µg/mL equivale al 101.78%. Se observa un ligero aumento sobre lo agregado, puede deberse a irregularidades en el equipo o fallas en la determinación por parte del analista, pero que se pueden tomar como no significativos.

Concentración de Cafeína (µg/mL)	Absorbancia	Concentración encontrada (µg/mL)	% de recuperación
5	0.2415	5.089µg/mL	101.78
5	0.2398	5.055µg/mL	101.1
5	0.2420	5.099µg/mL	101.98

Tabla 12. Evaluación de la concentración de cafeína (CF) al aplicar ultrasonidos a un estándar.

Concentración de Teobromina (µg/mL)	Absorbancia	Concentración encontrada (µg/mL)	% de recuperación
10	0.6175	10.03µg/mL	100.3
10	0.6180	10.04µg/mL	100.4
10	0.6198	10.07µg/mL	100.7

Tabla 13. Evaluación de la concentración de teobromina (TB) al aplicar ultrasonidos a un estándar.

IX. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS Y EXTRACCIÓN MANUAL Y PRUEBA DE t STUDENT

IX.1 PARA CAFEÍNA Y TOBROMINA

Con el objetivo de conocer si había diferencia significativa entre ambos métodos, se toman los resultados de las Tablas #, con los cuales se lleva a cabo un estudio de comparación entre medias donde se utilizan las siguientes ecuaciones y se propone la hipótesis nula de que las medias obtenidas en los dos métodos de estudio son iguales.

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde S se calcula a partir de la ecuación:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

Y t_l tiene n₁ + n₂ - 2 grados de libertad y x₁ y x₂ son las medias de los métodos evaluados. Existen 18 grados de libertad, así que el valor crítico de t_l es de 2.10 (p=0.005 en contraste de dos colas).

La tabla 14 muestra los valores del cálculo estadístico de la prueba de t student tanto para cafeína y teobromina para poder aceptar o rechazar H₀ planteada con anterioridad.

Muestra	TB	CF
Cocoa en polvo	6.43	3.99
t(crítico)	2.10	
α=0.05		

Tabla 14. Valores de t calculada y t crítico

El valor experimental de t_l es de 3.99 y t_l es de 6.43 respectivamente por lo que la diferencia entre los dos métodos resulta significativa a un nivel de significancia del 95%.

Se puede concluir que los resultados obtenidos entre los dos métodos son diferentes, rechazando la hipótesis nula que dice: que las medias son iguales, por lo que se acepta la hipótesis alterna y confirma que existe diferencia significativa entre los métodos.

MANUAL		
	Cafeína (mg/mL)	Teobromina (mg/mL)
	1.82	23.025
	1.79	23.106
	1.75	23.028
	1.85	23.04
	1.83	23.026
	1.84	23.13
	1.77	22.99
	1.76	23.08
	1.8	22.987
	1.79	23.16
PROMEDIO	1.8	23.0572
S²	0.001177778	2.354716981

Tabla 15. Concentraciones de cafeína y teobromina, encontradas por el método manual.

ULTRASONIDO		
	Cafeína (mg/mL)	Teobromina (mg/mL)
	2.13	25.79
	2.21	25.7
	2.22	26.2
	2.17	25.87
	2.15	25.89
	2.26	25.9
	2.29	25.82
	2.25	26.1
	2.16	25.98
	2.18	25.88
	2.202	25.913
	0.002773333	0.021623333
		PROMEDIO
		S²

Tabla 16. Concentraciones de cafeína y teobromina, encontradas por el método de ultrasonido.

En la gráfica 10 se muestra la cantidad encontrada de TB y CF tanto para el método de extracción manual (primeras dos columnas) como para extracción asistida por ultrasonidos focalizados (segundas dos columnas).

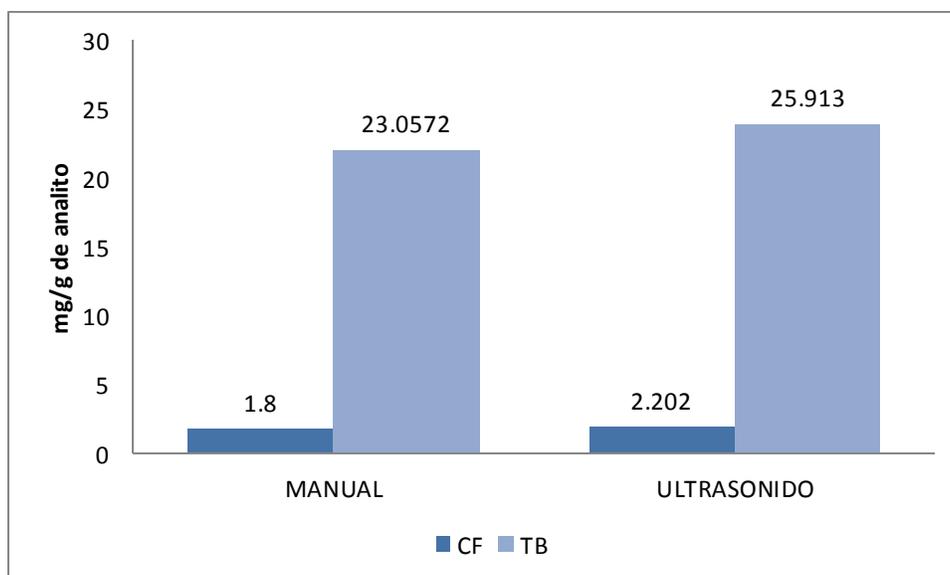


Gráfico 10. Concentración de teobromina (TB) y cafeína (CF) obtenidos por los métodos de extracción: manual y ultrasonidos focalizados.

En el método por el cual obtenemos una extracción con mayor eficiencia es con ultrasonidos focalizados, además se reduce la cantidad de volumen de cloroformo para la separación de ambas fases. Al realizar la metodología global se reduce el tiempo de análisis, como se puede observar en la Tabla 13.

Etapas de extracción	Tiempo de extracción manual (min)	Tiempo de extracción con US (min)
Extracción de CF y TB con agua	5	3
Extracción de cafeína con cloroformo	4	0.5
Separación de fases	10	10
TOTAL	19	13.5

Tabla 17. Tiempo total empleado en la extracción de CF y TB por ambos métodos.

Por el método de extracción con ultrasonidos focalizados, se forma una emulsión muy persistente después de agregar cloroformo y usar el equipo de ultrasonidos, pero se resuelve por centrifugación, que permite separar ambas fases más eficientemente que si se hace con embudos de separación.

Queda demostrando con ello que US fue mejor técnica de extracción de cafeína y teobromina, además de disminuir el tiempo de análisis un 33 %.

X. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS Y MICROONDAS Y PRUEBA DE T STUDENT

Con el objetivo de conocer si había diferencia significativa entre ambos métodos, se toman los resultados de las Tablas #, con los cuales se lleva a cabo un estudio de comparación entre medias donde se utilizan las siguientes ecuaciones y se propone la hipótesis nula de que las medias obtenidas en los dos métodos de estudio son iguales.

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde S se calcula a partir de la ecuación:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

Y t_l tiene n₁ + n₂ - 2 grados de libertad y x₁ y x₂ son las medias de los métodos evaluados. Existen 18 grados de libertad, así que el valor crítico de t_l es de 2.10 (p=0.005 en contraste de dos colas).

La tabla 17, muestra los valores del cálculo estadístico de la prueba de t student tanto para cafeína y teobromina para poder aceptar o rechazar Ho planteada con anterioridad.

Muestra	TB	CF
Cocoa en polvo	0.45	0.76
t(crítico)	2.10	
$\alpha=0.05$		

Tabla 18. Valores de t calculada y t crítico

Para el caso de análisis, se planteó Ho (donde to es la t calculada):
 $t_o < 2.10$

Por lo tanto se acepta Ho, y se concluye que no existe diferencia significativa entre los métodos de extracción para ambos analitos.

Dentro de las ventajas del método por US en comparación con el MOS, encontramos: disminución en el tiempo de extracción; ya que en US nos lleva 3 minutos y por MOS son cinco minutos, en el caso de MOS se ocupa mucho tiempo montando el equipo, además de que la temperatura se incrementa después del uso de microondas lo que complica su manipulación y aumenta el tiempo de espera para que éstas lleguen a temperatura ambiente.

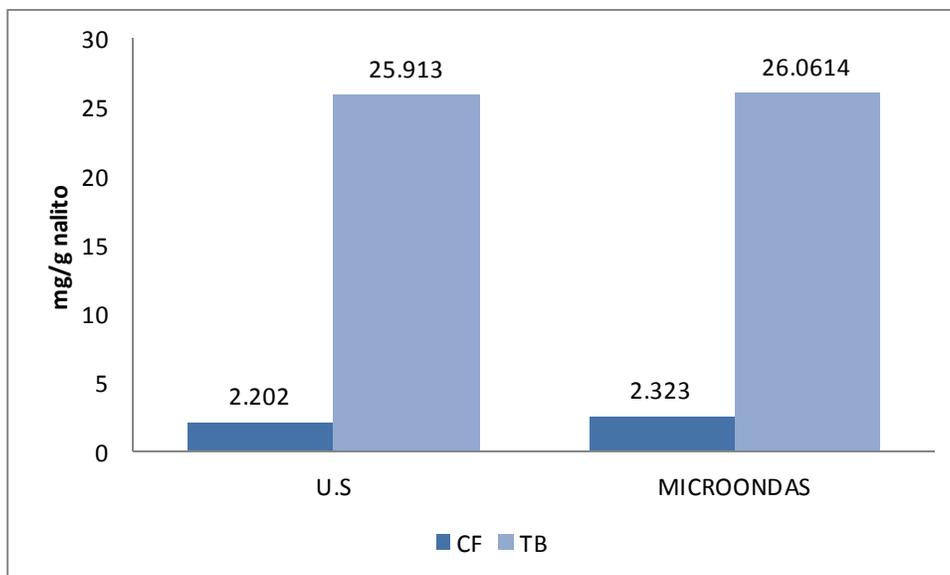
MICROONDAS		
	Cafeína (mg/mL)	Teobromina (mg/mL)
	2.33	26.234
	2.35	25.106
	2.29	25.028
	2.42	26.457
	2.3	26.124
	2.28	26.130
	2.37	25.990
	2.23	26.080
	2.27	26.987
	2.39	26.478
PROMEDIO	2.323	26.0614
S²	0.003534444	0.35681716

Tabla 19. Concentraciones de cafeína y teobromina, encontradas por el método asistido por microondas focalizadas.

ULTRASONIDO		
	Cafeína (mg/mL)	Teobromina (mg/mL)
	2.13	25.79
	2.21	25.7
	2.22	26.2
	2.17	25.87
	2.15	25.89
	2.26	25.9
	2.29	25.82
	2.25	26.1
	2.16	25.98
	2.18	25.88
	2.202	25.913
	0.002773333	0.021623333
		PROMEDIO
		S²

Tabla 20. Concentraciones de cafeína y teobromina, encontradas por el método asistido por ultrasonidos focalizados.

En la gráfica 11 se muestra la cantidad encontrada de TB y CF tanto para el método de extracción asistido por microondas focalizadas (primeras dos columnas) como para extracción asistida por ultrasonidos focalizados (segundas dos columnas).



Gráfica 11. Concentración de teobromina (TB) y cafeína (CF) obtenidos por los métodos de extracción: ultrasonidos y microondas focalizados.

XI. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA EL MÉTODO MANUAL Y PARA EL MÉTODO POR ULTRASONIDOS.

Para conocer la precisión del método se evaluó su repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio. Esta evaluación requiere contar con un estándar de preferencia certificado, o bien realizar el análisis repetido de una muestra, por el mismo analista con el mismo instrumento en un lapso corto de tiempo. En este caso se hizo el análisis por 7 días consecutivos en cocoa en polvo.

XI.1 Método: Manual (Convencional)

Las tabla 21 muestra los resultados encontrados de cada analito (cafeína y teobromina) evaluados en cocoa en polvo comercial por el método de extracción manual (convencional).

Día	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2
	mg CF/g cocoa	mg TB/g cocoa	mg CF/g cocoa	mg TB/g cocoa
1	1.8	22.76	1.82	22.52
2	1.87	22.63	1.83	22.8
3	1.87	20.46	1.86	19.63
4	1.81	22.84	1.8	21.59
5	1.7	22.17	1.74	22.27
6	1.83	21.83	1.86	22.12
7	1.76	22.96	1.84	22.33

Tabla 21. Resultados para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad de cafeína y teobromina, por el método de extracción manual a partir de cocoa en polvo comercial.

XI.2 Caso 1: Repetibilidad y Reproducibilidad para CF

Posteriormente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), que en la Tabla 22 indica la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (gl) y los cuadrados medios (CM) entre días y dentro de días para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad en cocoa en polvo comercial por el método de extracción manual.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	0.0293407	6	0.004890109
Dentro de los grupos	0.0049858	7	0.000712251
Total	0.0343264	13	

Tabla 22. Análisis de varianza para CF, por el método de extracción manual.

- ❖ Cálculos para la repetibilidad relativa dentro de los días de estudio S_R y la reproducibilidad relativa entre días S_{WR} para cafeína.

La variación entre días repetibilidad (S_R^2) se determinó tomando en cuenta que S^2 , igual a la media de cuadrados dentro de días. Esto puede verse más claro en la ecuación:

$$S_R = \sqrt{CM_{\text{dentro de días}}}$$

$$S_R^2 = 0.000712251$$

$$S^2 = \frac{(0.004890109 - 0.000712251)}{2} = 0.002088929$$

Para calcular la reproducibilidad dentro del laboratorio (S_{WR}^2), e determinó de acuerdo a las ecuaciones siguientes, donde n_j es el número de replicas por día.

$$S^2 = (CM_{\text{entre días}} - CM_{\text{dentro de días}} / n_j)$$

$$S_{WR}^2 = S_R^2 + S^2_{\text{entre días}}$$

S_R^2 es la media de cuadrados dentro de días, (Miller et al., 2002).

$$S_{WR}^2 = 0.002088929 + 0.000712251 = 0.00280118$$

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{0.000712251}}{1.8168} \right) 100 = 1.47\%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{0.00280118}}{1.8168} \right) 100 = 2.91\%$$

XI.3 Caso 2: Repetibilidad y Reproducibilidad para TB

La Tabla 23 indica el ANOVA para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad en cocoa en polvo comercial por el método de extracción manual.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	10.41574315	6	1.7359572
Dentro de los grupos	1.41647294	7	0.2023533
Total	11.83221609	13	

Tabla23. Análisis de varianza para (TB), por el método de extracción manual.

- ❖ Cálculos para la repetibilidad relativa dentro de los días de estudio S_R y la reproducibilidad relativa entre días S_{WR} para la teobromina por el método de extracción manual.

$$S_R^2 = 0.2024$$

$$S^2 = \frac{(1.7360 - 0.2024)}{2} = 0.7368$$

$$S_{WR}^2 = 0.2024 + 0.7368 = 0.9692$$

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{0.2024}}{22.069} \right) 100 = 2.0384\%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{0.9692}}{22.069} \right) 100 = 4.4609$$

XII. Método: Ultrasonidos Focalizados (Propuesto)

Las tabla 24 muestra los resultados encontrados de cada analito (cafeína y teobromina) evaluados en cocoa en polvo comercial por el método de extracción con ultrasonidos focalizados (propuesto).

Día	replica 1	replica 1	replica 1	replica 2
	mg CF/g cacao	mg CF/gcacao	mg TB/g cacao	mgTB/gcacao
1	1.89	1.85	24.88	24.58
2	1.95	2.16	24.91	24.59
3	1.98	1.94	20.97	21.07
4	2.12	1.89	24.42	24.53
5	1.96	1.98	23.28	23.35
6	2.11	1.96	23.58	24.25
7	1.91	1.84	23.56	23.06

Tabla24. Resultados para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad de cafeína y teobromina, por el método de extracción asistida por ultrasonidos focalizados a partir de cocoa en polvo comercial.

XII.1 Caso 1: Repetibilidad y Reproducibilidad para CF

La Tabla 25 indica el ANOVA para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad en cocoa en polvo comercial por el método de extracción asistida por ultrasonidos focalizados.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	0.064369096	6	0.010728183
Dentro de los grupos	0.067230308	7	0.00960433
Total	0.131599403	13	

Tabla 25. ANOVA para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad en cocoa en polvo comercial por el método de extracción asistido por ultrasonidos focalizados.

- ❖ Cálculos para la repetibilidad relativa dentro de los días de estudio S_R y la reproducibilidad relativa entre días S_{WR} para cafeína.

$$S_R^2 = 0.00960433$$

$$S^2 = \frac{(0.010728183 - 0.00960433)}{2} = 0.000561926$$

$$S_{WR}^2 = 0.000561926 + 0.00960433 = 0.010166256$$

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{0.00960433}}{1.9681} \right) 100 = 4.98\%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{0.010166256}}{1.9681} \right) 100 = 5.12\%$$

XII.2 Caso 2: Repetibilidad y Reproducibilidad para TB

La Tabla 26 indica el ANOVA para la determinación de repetibilidad y reproducibilidad en cocoa en polvo comercial por el método de extracción asistido por ultrasonidos focalizados.

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>
Entre grupos	17.6945	6	6.04226935
Dentro de los grupos	1.81841	7	0.25977351
Total	38.072	13	

Tabla26. Análisis de varianza para (TB), por el método de extracción asistida por ultrasonidos focalizados.

- ❖ Cálculos para la repetibilidad relativa dentro de los días de estudio S_R y la reproducibilidad relativa entre días S_{WR} para teobromina por el método de extracción asistida por ultrasonidos focalizados.

$$S_R^2 = 0.25977351$$

$$S^2 = \frac{(6.04226935 - 0.25977351)}{2} = 2.89124792$$

$$S_{WR}^2 = 2.89124792 + 0.25977351 = 3.015102143$$

$$\text{Repetibilidad} = \left(\frac{\sqrt{0.25977351}}{23.932347} \right) 100 = 2.13\%$$

$$\text{Reproducibilidad} = \left(\frac{\sqrt{2.89124792}}{23.932347} \right) 100 = 7.10\%$$

En la Tabla 27, se encuentra el resumen de los cálculos y tablas anteriores, observando que la repetibilidad relativa dentro de los días resultó tener un porcentaje menor que la reproducibilidad relativa entre días para ambos casos, es decir que existe una mayor variabilidad en la respuesta de extracción entre días para ambos analitos, siendo mayor para cafeína ya que se lleva a cabo una segunda extracción con cloroformo por ambos métodos, [Miller, et.all, 2002].

DATOS		Método de Extracción	
		Manual (mg/mL)	Ultrasonido (mg/mL)
Repetibilidad	cafeina	1.47	4.98
	teobromina	2.04	2.13
reproducibilidad	cafeina	2.91	5.12
	teobromina	4.46	7.1

Tabla 27. Repetibilidad y reproducibilidad, por los métodos extracción manual y extracción asistida por ultrasonidos focalizados. Los datos están expresados como desviación estándar relativa (%).

Aunque los valores de precisión por ultrasonidos son mayores que por el método manual se encuentran dentro de los límites para este tipo de muestras (10 %) en los niveles de concentración estudiados, demostrando que el sistema propuesto es preciso para la determinación de analitos extraído.

XIII. ANALISIS DE MUESTRAS

El análisis de muestras de grano de cacao y cascarilla de ambos lotes se realizó por los tres métodos de extracción; el propuesto (US), el convencional (Manual) y el asistido por microondas focalizadas (MOS).

En primer lugar se determinó el porcentaje de humedad y grasa en el cacao de ambos lotes. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Al igual como se había clasificado previamente a los lotes de forma visual, se comprueba que el lote 1 es menos húmedo que el lote 2, y de acuerdo a la NOM-186-SSA1/SCFI-2002, el grano del lote 2 no cumple con los requerimientos de buena calidad, ya que los granos clasificados en calidad I tienen una humedad no mayor al 8%.

En el caso del porcentaje de grasa, ambos lotes contienen un porcentaje de grasa adecuado, ya que este puede llegar a ser hasta de un 54%.

MUESTRAS	PARÁMETRO	
	% DE HUMEDAD	% DE GRASA
Lote 1	5.19±0.51	28.50±0.5
Lote 2	8.09±0.0002	27.00±0.59

Tabla28. Pruebas fisicoquímicas realizadas a los granos de cacao.

En la Tabla 29 se muestran las concentraciones de ambos analitos en los lotes evaluados.

Muestra	Lote	MÉTODO					
		US(mg/gmuestra)		Manual(mg/gmuestra)		MOOS(mg/gmuestra)	
		CF	TB	CF	TB	CF	TB
Grano	L1	2.16	25.91	1.37	18.04	2.20	26.10
	L2	1.81	20.19	1.16	18.54	1.85	21.13
Cascarilla	L1	1.31	16.10	1.01	13.27	1.40	17.14
	L2	1.11	14.17	0.99	13.18	1.22	16.56

Tabla 29.- Concentración de cafeína (CF) y teobromina (TB) por los tres métodos de extracción en ambos lotes.

Los resultados indican que a partir de la cascarilla de los granos de cacao se obtiene una gran concentración de analitos, por lo que nos sugiere que parte de ésta puede ser molida y agregada a la cocoa en polvo, dando como resultado cocoa en polvo de mala calidad.

Las concentraciones de cafeína y teobromina disminuyeron en el lote 2, debido a que en este se obtuvo una humedad de 8.09%, mayor comparada con la del Lote 1 (5.19%) por lo tanto al haber una mayor humedad en un gramo de muestra hay más porcentaje de agua.

XIV. ANÁLISIS DE CHOCOLATES

En este caso se tienen muestras sólidas y líquidas, para las tres muestras líquidas se realizó una dilución previa, tomando 10mL de producto en 100mL de agua destilada, para la posterior cuantificación de analitos. Es importante mencionar que; debido a su difícil manipulación solo se realizó la extracción por el método de US.

Para las once muestras restantes se desengrasaron antes de su extracción. En la Tabla 30 se muestran las concentraciones de ambos analitos para todas las muestras y con los tres métodos de extracción.

muestra	Método					
	US		Manual		MOOS	
	CF	TB	CF	TB	CF	TB
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g
1	2.16	25.91	1.87	23.04	2.21	25.97
2	1.18	18.63	1.01	15.52	1.23	18.98
3	1.48	16.75	1.2	14.88	1.54	16.84
4	1.84	20	1.52	16.75	1.9	20.48
5	1.95	23.12	1.56	20.25	1.99	23.39
6	0.95	10.75	0.8	9.5	1.05	10.85
7	1.04	9.38	0.85	8.29	1.1	9.45
8	0.49	3.8	0.4	3.4	0.52	4.2
9	0.84	9.08	0.7	8.01	0.98	9.15
10	1.33	16.22	1.09	14.4	1.42	16.3
11	0.15	0.34				
12	0.12	0.24				
13	0.55	2.36	0.47	2.1	0.62	2.4
14	1.39	18.9	1.37	18.04	1.44	18.95

*Número de muestra que se indicó previamente.

Tabla 30.- Concentración de cafeína (CF) y teobromina (TB) por los tres métodos de extracción en las diferentes muestras.

En el caso de las muestras de chocolate que expresa el contenido de cacao o cocoa (Chocolate amargo 70% de cocoa, Chocolate amargo 85% de cocoa, Chocolate amargo 90% de cocoa, Chocolate semiamargo 42% de cacao), la cantidad de analitos encontrada es similar al porcentaje reportado en la etiqueta de cada producto. Sin embargo en las muestras que no indican la cantidad de cacao a usar, se pudo ver que las cantidades de cacao para su elaboración son mínimas.

Es notorio el efecto que causa la extracción con US ya que las concentraciones de ambos analitos son superiores a los resultados encontrados por el método manual. A diferencia de esto en el caso de los resultados de la extracción asistida por microondas focalizadas se obtiene un ligero aumento en las concentraciones encontradas, pero dicho incremento resulta no ser altamente significativo.

Es por eso que para la extracción de ambos analitos (cafeína y teobromina) la metodología asistida por ultrasonidos focalizados es más recomendable de usar, ya que la eficiencia de extracción aumentó entre un 15 % y un 25 % para CF y entre 12 % y 20 % para TB, además de observar una reducción en el tiempo de extracción de las muestras de cacao y derivados, menor cantidad de solventes a usar y mucho más fácil manipulación de equipo en comparación con los otros métodos.

XV. FORTIFICACIÓN

Se llevó a cabo la fortificación de las muestras de chocolates sólidos y líquidos. Se elaboro un estándar tanto para cafeína como para teobromina, el cual se añadió a las concentraciones previamente conocidas, para verificar el porcentaje de recuperación y si el uso de ultrasonidos altera la concentración de analitos.

Para el caso de Cafeína se preparo un estándar de concentración: 2.16 $\mu\text{g/mL}$, para lo cual; se pesó 2.7mg de cafeína en un vaso de precipitados de 50mL, para disolverlo se agregaron 10mL de cloroformo, se trasvasó a un matraz volumétrico de 25mL y se llevo al aforo con cloroformo.

Posteriormente se tomaron 20mL de la solución anterior llevándose a un matraz volumétrico de 100mL que se llevo al aforo con cloroformo, de aquí se tomó 1mL en un matraz volumétrico de 10mL llevándose al aforo con cloroformo.

El estándar de teobromina se preparó de la siguiente manera: se pesó 6.4mg de teobromina en un vaso de precipitados de 50mL a los cuales se les agregó 10mL de agua destilada, se trasvaso a un matraz volumétrico de 25mL y se aforo con agua destilada. Se tomaron 20mL de la solución anterior en un matraz volumétrico de 100mL aforándose con agua destilada, de aquí se tomó 1mL en un matraz volumétrico de 25mL y se aforo con agua destilada.

En las Tablas 31 y 32 se observa que el porcentaje de recuperación tanto para cafeína como para teobromina están cerca del 100%, por lo tanto el uso de ultrasonido favorece la extracción de los analitos sin alterar su estructura o concentración.

Muestra	Concentración muestra	Concentración extracto	Concentración a agregar	Concentración resultante	% Recuperación
	mg/g	µg/mL	µg/mL	µg/mL	
1	2.16	22.95	2.16	25.14	100.12
2	1.18	12.54	2.16	14.72	100.14
3	1.49	12.50	2.16	14.70	100.27
4	1.63	12.25	2.16	14.46	100.34
5	2.21	15.03	2.16	17.23	100.23
6	1.28	12.21	2.16	14.42	100.34
7	1.08	11.42	2.16	13.63	100.37
8	0.84	8.29	2.16	10.51	100.57
9	1.09	11.02	2.16	13.23	100.38
10	1.23	11.09	2.16	14.33	100.15
11	0.07	6.96	2.16	9.15	100.32
12	0.04	4.44	2.16	6.64	100.61
13	0.75	7.02	2.16	9.23	100.54

*Número de muestra que se indicó previamente.

Tabla31. Porcentaje de recuperación en la fortificación para cafeína.

Muestra	Concentración muestra	Concentración extracto	Concentración a agregar	Concentración resultante	% Recuperación
	mg/g	µg/mL	µg/mL	µg/mL	
1	25.91	6.62	2.048	8.70	100.37
2	18.63	4.76	2.048	6.81	100.03
3	23.99	5.95	2.048	8.01	100.15
4	24.01	6.20	2.048	8.25	100.02
5	34.88	7.02	2.048	9.1	100.35
6	21.84	17.50	2.048	19.57	100.11
7	27.71	8.70	2.048	10.77	100.20
8	10.72	7.83	2.048	9.89	100.12
9	10.41	7.63	2.048	9.70	100.23
10	15.93	10.61	2.048	12.67	100.09
11	0.40	5.85	2.048	7.90	100.02
12	0.29	4.32	2.048	6.38	100.19
13	8.28	5.75	2.048	7.81	100.15

*Número de muestra que se indicó previamente.

Tabla32. Porcentaje de recuperación en la fortificación para teobromina.

XVI. CONCLUSIONES

Para la extracción de teobromina y cafeína la metodología de extracción asistida por ultrasonidos focalizados es más recomendable de usar que la metodología de extracción convencional por agitación magnética ya que la eficiencia de extracción aumentó entre un 15 % y un 25 % para CF y entre 12 % y 20 % para TB.

La extracción con ultrasonidos focalizados tiene otras ventajas, como son: 1) menor tiempo de extracción de ambos analitos de las muestras de cacao y derivados, 2) menor cantidad cloroformo para la extracción de cafeína y 3) el procedimiento es mucho más fácil de manipular en comparación con el método de extracción manual.

Con respecto al método de extracción por microondas focalizadas obtenemos ligeros aumentos en la concentración de analitos pero no significativos, junto con esto tenemos los inconvenientes del equipo al montarlo, el sobrecalentamiento de las muestras y el tiempo que se añade para su culminación del experimento, por lo que confirma al método de extracción por ultrasonidos como el más recomendable.

En cuanto a las muestras, se pudo ver que la cascarilla del cacao contiene una alta cantidad de teobromina y cafeína, puede prestarse a que en la industria se pulverice y utilice como ingrediente en la elaboración de chocolates de baja calidad.

En el caso de las muestras de chocolate, la cantidad de analitos encontrada es similar al porcentaje reportado en la etiqueta de cada producto. Sin embargo en las muestras que no indican la cantidad de cacao a usar, se pudo ver que las cantidades de cacao para su elaboración son mínimas.

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

XVII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abril Díaz Nieves, Bárcena Ruíz Antonio, Fernández Reyes Emilio. Espectrofotometría: *Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Departamento de Biología Molecular. 2001/Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa 14071- Córdoba Argentina.
2. Derache, J. "Toxicología y seguridad de los alimentos". Ed. Omega. 1990.
3. Fessenden R.J. and Fessenden J. S., *Organic Laboratory Techniques*, Brooks/Cole, USA, 1993
4. García Yanes Mario. *El cacao: Origen, Cultivo e Industrialización en Tabasco*. Centro de Investigación de Ciencias Agropecuarias, 1994. Pág. 11.
5. AO, M. & Llu, C. 2005. "Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa Maxim*". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21: 1461-1463.
6. Berlitz H.D. *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España). (1992) 1035-1047.

7. Miller, N. James y Miller, J.C ESTADISTICA Y QUIMIOMETRIA PARA QUIMICA ANALITICA. 4ª ed. Editorial Prentice Hall. Madrid 2002.21-30, 50-64.
8. Montgomery, Douglas C. *Diseño y análisis de experimentos*. 2ª ed. Editorial Limusa Wiley, año 2010.33-45. 60-70pp.
9. Mulet, A., Carcel, J. A., Bon, J. & San Juan, N. 2003. "New food drying technologies- use of ultrasound". Food Science and Technology International. 9(3):215-221.
10. Risner C.H., Kiser *High-performance liquid chromatography procedure for the determination of flavor enhancers in consumer chocolate products and artificial flavors*. M.J.,2008 Journal of the Science of Food and Agriculture,pp.1324-1430.
11. Rostagno, M., Palma, M. & Barroso, C. 2003. "ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones". Journal of Chromatography A. 1012: 119-128
12. Sonochemistry Centre, School of Science and the Environment, Coventry university. CSIC, 2004. *Los ultrasonidos mejoran la extracción por fluidos supercríticos*.
13. Statgraphics Plus Windows versión 2.1, Rockville, M.D., 1992.
14. D. Ghosh y E.D. Nichols. *Shynthesis*. (1996) 195.
15. J.R.J. Pare y J.M.R. Belanger, S.S. Stanfford. *Trends. Anal. Chem.* 13(1995) 4250.
16. M. Letellier y H. Budzinski, *Analisis*. 27(1999) 259.
17. C. Demesmay y M. Olle. *Spectra. Analyse*. 175(1993) 27.
18. K.K.Chee, M.K.Wong y H.K.Lee. *J.Chromatogram, A* 723(1996) 259.
19. S.P.Frost, J.R.Dean, K.P.Evans, K. Harradine, C. Cary y M.H.I.Camber. *Analyst*.122 (1997) 895.
20. N.Saimy J.R.Dean, M.P.Abdullah y Z. Zakaria. *J.Chromatogram A*. 791 (1997)361.
21. I.J.Barnabas, J.R. Dean y I.A.Fowlis. S.P.Owen. *Analyst*. 120(1995)1897.
22. V. López-Avila y J.Benedicto. *Trends. Anal. Chem.* 15 (1996) 334.

23. H. Budzinski, A. Papineau, P. Baumand y P. Garrigues. C.R. Acad. Sci. Paris. 321 (1995) 69.
24. M. Letellier y H. Budzinski. Analyst. 124 (1999) 5.
25. M. Letellier y H. Budzinski y P. Garrigues. LC-GC Int. 12 (1999) 222.

XVIII. ANEXO A (Artículo)

Ultrasound-Assisted Method for Extraction of Theobromine and Caffeine from Cacao Seeds and Chocolate Products

L. Peralta-Jiménez · M. P. Calizares-Macias

Received: 28 August 2012 / Accepted: 22 November 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract An ultrasound-assisted method for extraction of theobromine (TB) and caffeine (CF) from cacao seeds and chocolate products was developed. This extraction was carried out in 100 mL of heated water at 80 °C by using a 12.7-cm i.d. ultrasound probe and applying 240 W of power for 180 s. In order to quantify TB and CF, the aqueous extracts were treated with Carriz reagent to remove interferences. Then, 10 mL of the aqueous extract was adjusted at pH 12.5 and 10 mL of chloroform solvent was added. Ultrasound radiation was applied at 150 W of power for 30 s in order to transfer CF to the organic phase. The resulting emulsion was centrifuged at 5,000 rpm for 5 min to separate the phases. The photometric monitoring was at 276 nm for CF and at 275 nm for TB. This extraction method is simpler than the conventional liquid-liquid extraction which uses separatory funnels, and obtains similar results. By applying ultrasound in cacao seeds, the efficiency of extraction increased by 57.7 % for CF and 43.6 % for TB and by between 12 and 23 % for both analytes in chocolate products, in comparison with those results obtained by a conventional stirring extraction method.

Keywords Ultrasound-assisted extraction · Theobromine · Caffeine · Cacao seeds · Chocolate products

Introduction

The isolation of the target analytes from a solid matrix is one of the most critical analytical steps. Problems arise such as the possibility of analyte loss or contamination during sample preparation. Besides, it is a time-consuming process and

involves high solvent consumption. The conventional Soxhlet extraction used to extract analytes from solid samples is a well-established model. However, despite being straightforward and cheap, it is slow and tedious.

In the last decade, there has been an increasing demand for new extraction techniques enabling automation, shorter extraction time, and reduction of organic solvents consumption (Stechová et al. 2004; Valdez-Flores and Calizares-Macias 2007). Advances in preparation of solid samples have brought about a great number of new techniques such as ultrasonic radiation, which shortens the steps of the analytical process (extraction, reaction, synthesis, and mixing) in comparison with other methods where this energy is not used (Calizares-Macias et al. 2004; Valdez-Flores and Calizares-Macias 2007; Chandrapala et al. 2012; Pingret et al. 2012).

Sound waves produce mechanical vibrations in a solid, liquid, or gas and are fundamentally different from electromagnetic waves. Thus, while the latter (radio waves, infrared rays, X-rays, gamma rays, visible or ultraviolet light rays) can pass through a vacuum, sound waves must travel in matter as they involve expansion and compression cycles travelling in a medium. In a liquid, the expansion cycles produce a negative pressure (Suslick 1996). Ultrasonic radiation is generated by immersing the reactor into an ultrasonic bath or directly introducing the source, i.e., a probe (Hong et al. 1999) or a transducer (Vinodgopal et al. 1998) into the reactor. An ultrasonic cleaning bath is the most widely used and cheapest source of ultrasound, but it does not produce better sonochemical effects than probe-type ultrasonic irradiation (Goel et al. 2004).

The most important effects of ultrasound on liquid–solid systems are mechanical and attributed to symmetric as well as asymmetric cavitations. In addition, shockwaves that have potential to create microscopic turbulence are produced within interfacial films surrounding nearby solid particles also referred to as micro-streaming (Thompson and Doraiswamy 1999; Hamdaoui et al. 2008). Asymmetric

L. Peralta-Jiménez · M. P. Calizares-Macias (✉)
Facultad de Química, Departamento de Química Analítica,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México D.F. 04510, México
e-mail: calizares@quim.unam.mx

collapse leads to the micro-jet formation of solvent that collides with the solid surface with tremendous force, resulting in newly exposed and highly reactive surfaces, as well as erosion and ejection. These phenomena increase the rate of mass transfer near the surface and enhance the reaction rate (Song et al. 2009). Ultrasound is also known to facilitate extraction processes (Laque de Castro and Priego-Lago 2005; Horžić et al. 2012). The effects of ultrasound on leaching are also essentially primarily related to cavitation. Thus, the implosion of bubbles formed during ultrasound application produces rapid adiabatic compression of gases and vapors within the bubbles or cavities, resulting in an increase of temperature and pressure. The increased temperature enhances the solubility of the analytes in the leachant and facilitates their diffusion from the sample matrix to the outer regions; on the other hand, the increased pressure facilitates the penetration of the leachant into the sample matrix, and the analyte transfer from the matrix to liquid phase at the interface.

Cocoa is one of the most consumed seeds as ingredient in beverages, pastries, or candies. Cocoa products are rich in polyphenols, especially procyanidins, whose concentrations vary depending on their origin (Niemenak et al. 2006; Kames et al. 2012) and processing conditions (Samra et al. 2006). Procyanidins have been found to be health beneficial because of their antioxidant (Othman et al. 2007) and anti-inflammatory properties (Ramiro et al. 2005). Flavonoids from *Theobroma cacao* downregulate inflammatory mediators and anti-atherosclerotic activity (Vinson et al. 2006). In addition to procyanidins, cacao samples also contain alkaloids such as theobromine (TB) and caffeine (CF). These compounds affect the flavor of cacao products (Luna et al. 2002) and have received increasing attention due to their physiological effects (Bucheil et al. 2001). Their importance lies on their incidence over the central nervous system and on the fact that each person reacts differently according to the ingested amount (Yamada et al. 2009).

TB and CF in cacao are found in a quantity of 0.2 and 1.2 %, respectively, but these values depend on variety, harvest, curing process, etc. Therefore, the extraction procedure and quantification of these analytes are important in order to know about the origin and quality of cacao.

Due to the high solubility of TB and CF in water, the extraction of these compounds has been carried out by using this solvent, which allows simple extraction procedures. AOAC method describes the extraction of TB and CF from cacao seeds and cacao products using 95 mL of hot water (100 °C) and by stirring for 25 min (AOAC Official Method 2005). Brunetto et al. (2007) have carried out the extraction of both analytes using hot water at 80 °C and stirring for 5 min. Reflux with water for 60 min has also been used (Lo Coco et al. 2007), but the results have been similar to those obtained by stirring for 5 min (González-Núñez and

Calizares-Macias 2011). On the other hand, during these extraction processes, interferences such as polyphenols, proteins, and other compounds with high molecular weight are also extracted and must therefore be removed from the extracts by addition of Carrer I and Carrer II reagents, as they are measured at the same TB and CF wavelengths (Shufes et al. 1993).

In this paper, an aqueous extraction method applying ultrasound to cacao seeds and products of chocolate to extract TB and CF has been developed. For the extraction, an ultrasound probe was used, and the results were compared with those obtained without using ultrasonic waves. The quantification was carried out by UV spectroscopy; therefore, it was necessary to separate CF from aqueous extract with chloroform. This process was carried out by applying ultrasound radiation with a probe while power and irradiation time were evaluated.

Material and Methods

Instrumentation

Ultrasonic irradiation was applied by means of a Branson 450 digital sonifier (20 kHz, 400 W, Danbury, CT, USA) equipped with a cylindrical titanium alloy microprobe (13 mm diameter). A UV-vis spectrophotometer Cary 3 from Varian (Sydney, Australia) was used to measure CF and TB at 176 and 273 nm, respectively. A magnetic stirring (Comarac, Mexico City) with controlled temperature, a centrifuge (HETECH model HSA 20, Hackensack, England), an oven (Rios Rocha, Mexico City), and a pH meter (Oakton, Vernon Hills, IL, USA) were also used in the treatment of the samples.

Statgraphics Plus 4.0 software (Statistical Graphics, Rockville, MD) was used for the designing of tests and data analysis.

Reagents and Solutions

All used reagents were analytical grade. In order to remove polyphenols and proteins, the obtained aqueous extracts from cacao seeds and chocolate samples were treated with Carrer I solution [74 g of $Zn(CH_3COO)_2$ (Sigma, Toluca, Mexico) was weighed and dissolved into 100 mL of a 3 % CH_3COOH solution (Merck, Naucalpan, Mexico)] and $NaHCO_3$ powder (Baker-Mallinkroft, Mexico City). Fats were removed from the cacao seeds with petroleum ether (Baker-Mallinkroft, Mexico City). Chloroform solvent (Baker-Mallinkroft, Mexico City) was used to carry out the extraction of CF from the aqueous extracts. A TB (Fluka, Toluca, Mexico) aqueous stock solution of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ was used to set the TB standard solutions. Chloroform as solvent

was used in order to prepare the CF stock solution (Sigma, Toluca, Mexico) of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. For the extractions with chloroform, the pH of the aqueous extracts was adjusted at 12.5–12.7 with $1.0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$.

Samples

The used samples were: (a) cacao seeds from Comalcalco, Tabasco, Mexico, bought at the local market; (b) cacao peels obtained from the Comalcalco cacao seeds; and (c) cacao products such as chocolate bars, chocolate beverages, and commercial cocoa powder.

Sample Treatment

Solid samples of cacao were ground into soft powder in a ceramic mortar. Then, fats were removed with three portions of 5 mL of petroleum ether, shaken for 1 min, and allowed to stand for about 5 min each time. The petroleum ether extracts were combined and then filtered off, and the solvent excess was removed with N_2 . All analyses were carried out using 1 g of defatted sample.

Liquid samples were analyzed without previous treatment using 10 mL of sample.

Procedures

Extraction of TB and CF from Cacao Seeds and Chocolate Products

Ultrasound-assisted extraction method (UAE) was compared with a validated previously stirring method (SM) (González-Núñez and Cafizares-Macias 2011).

Stirring Method One hundred milliliters of hot distilled water (80°C) was added to 1 g of sample. The mixture was kept at 80°C and stirred for 5 min. Then, 5 mL of Carrez I was added, and it was stirred for 1 min. The mixture was left to settle until it reached room temperature; later, NaHCO_3 was added until precipitation stopped. The mixture was filtered off, and the remaining filtrate was transferred into a 100-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water. CF was separated from the aqueous extracts by carrying out multiples extractions with chloroform and using separatory funnels (see “Manual extraction” under “Extraction of CF from Aqueous Extracts” section; Shafiq et al. 1990; González-Núñez and Cafizares-Macias 2011).

Extraction of TB and CF from Cacao Seeds by the Proposed Ultrasound-Assisted Extraction Method One gram of solid sample was weighed and poured into a 250-mL beaker, and 100 mL of distilled water at 80°C was added. The ultrasound probe was placed at 1 cm from the top surface of the

liquid phase to allow a better interaction between the sample and the extractant. The ultrasound extraction was carried out at 240 W for 180 s. Next, 5 mL of Carrez I reagent was added, and it was stirred for 1 min. Then, NaHCO_3 was added until precipitation stopped. The mixture was filtered off, and the remaining filtrate was transferred into a 100-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water (solution A). CF was extracted from aqueous extracts with chloroform by applying ultrasound and using the probe (see “Proposed ultrasound extraction” under “Extraction of CF from Aqueous Extracts” section).

For liquid samples, 10 mL of beverage or syrup was diluted up to 100 mL with distilled water. They were directly treated with Carrez I reagent and NaHCO_3 and filtered off.

Validation of the Proposed UAIM for CF and TB A multi-factorial design methodology based on a factorial design 2^2 type V resolution allowing four freedom degrees and involving eight randomized runs plus three centre points was built, in order to carry out a screening study of the main factors affecting the extraction of TB and CF of cacao seeds. Therefore, power, irradiation time, and extractant volume were evaluated. The ANOVA test was calculated by Statgraphics software. Top and bottom values used in the factorial design were established according to previous studies. The evaluated values for the factorial design were: extraction volume (V), 25 mL and 70 mL; irradiation time (IT), 30 and 180 s; and power (P), 40 and 120 W.

With the aim of evaluating possible changes in the studied analytes by the ultrasonic radiation, two mixtures of known concentration of CF and TB (2 and 10 mg L^{-1}) under the same extraction conditions of the samples were analyzed.

In order to study the intra-laboratory reproducibility and repeatability, two independent extractions were also carried out for 7 days. The results were analyzed using an ANOVA test. A study of recoveries adding 2.5 mg of each analyte to 1 g of sample was also carried out.

Measurement of TB and CF from Aqueous Extracts

Extraction of CF from Aqueous Extracts With the purpose of simplifying the CF extraction from aqueous extracts using chloroform solvent as extractant, a novel ultrasound method using a probe was proposed. The method was compared with the conventional liquid-liquid extraction method, which uses separatory funnels and chloroform solvent.

Manual extraction: First of all, 50 mL of the diluted aqueous extracts (see “Stirring method” section) was transferred into a 100-mL separatory funnel, and about 5.5 mL of $1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ was added so as to regulate

the pH between 12.5 and 12.7. Then, these extracts were treated with four portions of 5 mL of chloroform, shaken for 1 min, and left to stand for about 5 min each time. After that, the chloroform extracts were combined in a 25-mL volumetric flask and diluted to volume with chloroform. Next, 1 mL of this solution was transferred into another 25-mL volumetric flask and diluted to volume with chloroform so that CF would be measured at 276 nm. The aqueous phase was next transferred into a 100-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water and filtered off. Ten milliliters was transferred into another 100-mL volumetric flask, and 50 mL of distilled water and 0.55 mL 10% HCl were added. Then, the solution was diluted with distilled water to volume. Finally, 1 mL was transferred into a 25-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water in order to measure TB at 271 (González-Núñez and Cañizares-Macias 2011).

Proposed ultrasound extraction:

The conventional liquid-liquid extraction is laborious and requires a great amount of organic solvent. With the aim of both simplifying the liquid-liquid extraction and of decreasing the amount of organic solvent, an ultrasound-assisted extraction method was developed. To begin with, 10 mL of diluted aqueous extract (see "Extraction of TB and CF from Cocoa Seeds by the Proposed Ultrasound-Assisted Extraction Method" section) was transferred into a 50-mL beaker, and about 5.5 mL of 1 mol/L NaOH was added to regulate the pH between 12.5 and 12.7. Then, 10 mL of chloroform was added, and the ultrasound probe was introduced into the glass at 0.5 cm from the top surface of the liquid. Next, a power of 160 W for 30 s was applied. After that, the mixture was separated and centrifuged at 5,000 rpm for 5 min, and 1 mL of chloroform phase was transferred into a 10-mL volumetric flask and diluted to volume with chloroform in order to measure CF. Finally, in order to analyze TB,

1 mL of the aqueous solution was transferred into a 50-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water.

Standard solutions with different concentrations of CF and TB treated under the same extraction conditions of the aqueous extracts were analyzed in order to validate the method, and recoveries were calculated.

Results and Discussions

Calibration Graphics

Two calibration curves were constructed in order to quantify TB and CF in cacao seeds and chocolate products. CF standards were prepared by using chloroform solvent, whereas for the TB ones, aqueous solutions were used. The obtained linear equation for TB was: $Abs = 0.05 (\pm 0.0005)[TB] + 0.018 (\pm 0.0035)$ with a linear range between 1 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a detection limit of 0.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and a regression coefficient of 0.9999. For CF, the equation was: $Abs = 0.05 (\pm 0.001)[CF] - 0.009 (\pm 0.011)$ with a regression coefficient of 0.9999, a detection limit of 0.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and linear range from 1 to 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Optimization of the Extraction of TB and CF from Cocoa Seeds by the Proposed Ultrasound Method (UAE-M)

The cacao seeds used for the analysis were high quality with regard to moisture (4.5 \pm 0.15 %), pH (5.1 \pm 0.25), and fats (24.6 \pm 3.2 %), in accordance with the specifications of the Mexican norm (NMX-FF-103-2003) (Mexican Norm NMX-FF-103-SCFI-2003 2003). Fats were removed from all the samples as previous studies demonstrated best results for the extraction of TB and CF from cacao seeds when fats are not present (González-Núñez and Cañizares-Macias 2011). The factorial design to evaluate power, irradiation time, as well as extractant volume was constructed in accordance with previous studies, according to which, volumes lower than 25 mL prevent a good mixing between the extractant and the sample. Therefore, 70 mL as maximum volume was selected to minimize the extractant amount and to allow a good mixing. Powers lower than 40 W caused very low extraction of caffeine but, as it considerably increased from this value up, it was selected as minimum value. The maximum power value 120 W was selected to evaluate the effect of power without damaging the probe. The irradiation time values were selected with the aim of decreasing the extraction time in comparison with the

Table 1 Matrix employed for studying the simultaneous effect of three variables, power (P^*), irradiation time (IT), and volume of extractant (V), on extraction of theobromine (TB) and caffeine from cacao seeds (CF) using an ultrasound extraction-assisted method (UAEAM)

Test	V (mL)	P (W)	IT (s)	CF ^a (mg g ⁻¹)	TB ^a (mg g ⁻¹)
1	-1 (25)	-1 (100)	-1 (180)	0.62±0.05	10.09±0.12
2	0 (47.5)	0 (80)	0 (100)	0.75±0.07	13.61±0.49
3	+1 (70)	-1 (40)	+1 (180)	0.64±0.01	13.84±0.15
4	+1 (70)	-1 (120)	-1 (30)	1.03±0.05	16.59±0.69
5	0 (47.5)	0 (80)	0 (100)	0.75±0.04	15.63±0.13
6	-1 (25)	-1 (10)	-1 (30)	0.75±0.07	6.86±0.18
7	-1 (25)	-1 (40)	-1 (180)	0.25±0.03	11.94±0.12
8	-1 (25)	-1 (120)	-1 (30)	0.29±0.04	13.66±0.15
9	+1 (70)	+1 (100)	-1 (180)	0.92±0.03	17.36±0.30
10	+1 (70)	-1 (40)	-1 (30)	0.94±0.02	15.81±0.08
11	0 (47.5)	0 (80)	0 (100)	0.71±0.04	14.40±0.22

Results, coded and real values (in parentheses) of the variables are indicated

^aMean±standard deviation ($n=3$)

batch method, but at the same time allowing enough contact time between sample and solvent. Table 1 shows the experimental design used with three central points. The ANOVA results are shown in Tables 2 and 3. The ANOVA table partitions the variability in TB and CF into separate pieces for each one of the effects. This then proves the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. The study was carried out at 95 % confidence level as P values are less than 0.05, indicating that they are significantly different from zero. The extraction volume was statistically significant for CF and TB, but only power was significant for CF. Nevertheless, at higher power, the TB extraction increased, and besides, when the power was low and the irradiation time was long, the extraction of TB and CF increased. Consequently, a second factorial design (2^2) was carried out by increasing the power and maintaining the same values above described for the irradiation time and by using 70 mL of extractant. In Table 4, the matrix employed is shown. After performing the experiments and measuring the response of the ANOVA, tests showed that both factors were not statistically significant. However, with higher irradiation and power, and after longer time, the extracted CF amount increased. Therefore, in order to improve the extraction, power was increased at 240 W (maximum power recommended for the used probe), and the irradiation time was tested at 180 and at 300 s. With this power, the extraction of TB and CF of cacao seeds increased 5 and 7 %, respectively. The increase in irradiation time did not improve the extraction of the analytes. A final test was carried out, in which the volume of extractant at 100 mL was increased. This volume was selected for two reasons: (1) because, in line with the first experimental design, the volume of extractant was an important factor of the extraction for both

analytes; and (2) since this volume had been proved already in the batch method as optimum. The extraction of both analytes was higher, between 2 and 3.2 % for TB and CF, respectively.

As a result, the selected optimum conditions of extraction of TB and CF by the proposed ultrasound extraction method (UAEAM) were: $P=240$ W, $IT=180$ s, and $V=100$ mL.

Finally, another test adding Carrier I reagent before and after the extraction using the optimum ultrasound extraction conditions was conducted. The extraction showed better results when the reagent was added afterwards as, when added before, a precipitate was formed and stirring was no efficient.

The precision of the proposed method in terms of within-laboratory reproducibility and repeatability was assessed by using a single experimental setup with duplicates. The repeatability and reproducibility values, expressed as relative standard deviation, showed high precision: 1.43 and 2.90 % for TB, and 4.03 and 4.87 % for CF, respectively.

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for theobromine (TB) at 95 % of confidence level from the results of the factorial design of Table 1

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value
A: V (mL)	41.6785	1	41.6785	0.0511
B: P (W)	18.7772	1	18.7772	0.0949
C: IT (s)	1.3278	1	1.3278	0.5859
AB	0.0392	1	0.0392	0.9252
AC	0.0288	1	0.0288	0.7993
BC	5.95125	1	5.95125	0.7854
Total error	15.1845	4	3.79615	
Total (corr.)	83.7473	10		

F values, P power, IT irradiation time

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for caffeine (CF) at 95 % of confidence level from the results of the factorial design of Table 1

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value
A: P (mL)	0.11065	1	0.11065	0.007
B: P (W)	0.1458	1	0.1458	0.0051
C: IT (s)	0.01005	1	0.01005	0.0117
AB	0.01445	1	0.01445	0.1546
AC	0.0747	1	0.0747	0.859
BC	0.06905	1	0.06905	0.2201
Total error	0.0188187	4	0.00470467	
Total (corr.)	0.511118	10		

P volume, F power, IT irradiation time

The recoveries obtained with standards in order to evaluate possible changes in the studied analytes under the same extraction conditions of the samples were: between 99.8 and 102.25 % for TB, and between 98.5 and 101.15 % for CF. These results show that the obtained values are within the precision of the method.

Comparative Study Between the UAEM and the SM

Cacao seeds were also analyzed by the SM, and the results were compared with those provided by the UAEM. *F* and *t* tests were conducted using the values of Table 5. The *F* test showed that there was no difference in variances, so the *t* test was calculated through an equal variance. The proposed null hypothesis was: media values of TB and CF in the samples are the same for both methods. The results showed that the values of the media were statistically different as the UAEM proposed method extracted a higher amount of the studied analytes than the SM [the calculated *t* value was higher than the critical value ($t_4=2.78$)]. With the UAEM, the extraction efficiency improved 57 % for CF and 40 % for TB, and

Table 4 Matrix employed for studying the simultaneous effect of the power (P) and irradiation time (IT) on extraction of theobromine (TB) and caffeine (CF) from cacao seeds (CF) using ultrasound extraction-assisted method (UEAM)

Test	P (W)	IT (s)	CF ^a (mg g ⁻¹)	TB ^a (mg g ⁻¹)
1	0 (180)	0 (105)	1.65±0.07	18.15±0.14
2	-1 (160)	-1 (30)	0.64±0.01	17.69±0.09
3	0 (180)	0 (105)	1.11±0.01	17.33±0.17
4	-1 (160)	+1 (180)	0.07±0.00	20.98±0.78
5	0 (180)	0 (105)	1.22±0.02	17.49±0.13
6	-1 (160)	+1 (180)	0.69±0.01	19.68±0.16
7	-1 (200)	-1 (30)	1.13±0.02	19.04±0.20

Results, coded and real values (in parenthesis) of the variables are indicated. Volume of extractant was adjusted at 70 mL

^aMean standard deviation ($n=3$)

Table 5 Determination of caffeine (CF) and theobromine (TB) in cacao seeds using the ultrasound-assisted extraction method (UAEM) and the stirring method (SM)

Sample	UAEM ^a		SM ^b	
	CF (mg g ⁻¹)	TB (mg g ⁻¹)	CF (mg g ⁻¹)	TB (mg g ⁻¹)
Cacao seeds	2.16±0.02	25.91±0.11	1.27±0.02	18.01±0.18
	1.91±0.02	25.19±0.16	1.16±0.015	18.54±0.14

Optimal conditions by UAEM: 240 W, 180 s, and 100 mL of water at 80 °C

^aMean standard deviation ($n=3$)

also, the extraction time decreased 60 %. The values were calculated using the average of all measurements.

Evaluation of the Extraction of CF from the Aqueous Extracts of Cacao Seeds Using an Ultrasound Probe

At the same time that the optimization of the TB and CF extraction from cacao seeds was carried out, a study aiming to separate CF and TB with chloroform from the aqueous extracts using the ultrasound probe was also performed. For the optimization, 10 mL of aqueous extract was used; this value was selected as the minimum volume for a good sonication with the 12.7-mm I.D. probe. In order to extract CF from the aqueous phase to the chloroformic phase and keep TB in the aqueous phase, the pH of the aqueous solutions was adjusted at 12.5–12.7 (Shafiq et al. 1990). Four combinations of the three key parameters for the extraction of CF such as power, irradiation time, and volume of chloroform were evaluated. The values were selected with the aim of decreasing the extraction time in comparison with separatory funnel extraction. The ultrasound probe was placed at 0.5 cm from the top surface of the liquid. In all the cases, an emulsion was formed within a few seconds after the ultrasound application. As the emulsion existed since the beginning of the extraction, emulsions were disrupted by centrifugation at 6,000 rpm for 5 min after the ultrasonic irradiation. The results of the tests are found in Table 6 and showed no statistical difference for any parameter. However, at 160 W, 7.5 mL, and 40 s, the values were a little higher. With the aim to minimize the method even more, lower volumes of chloroform and shorter irradiation times were tested. A volume of chloroform of 10 mL and an irradiation time of 30 s at 160 W of power were enough to extract CF with efficiency, which was proved by a recovery study using seven aqueous mixtures containing 5 µg mL⁻¹ of CF and 10 µg mL⁻¹ of TB. The solutions were treated under the same conditions used by the proposed method. The results showed recoveries between 99.20 and 102.23 %

Table 6 Evaluation of extraction of caffeine (CF) from aqueous extract of cacao seeds by applying ultrasonic irradiation by means of a probe of 12.7 mm in L

Volume of dissolution (mL)	Power (W)	Irradiation time (s)	CF ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)	TB ^a ($\mu\text{g g}^{-1}$)
25	150	30	2.16 \pm 0.07	19.77 \pm 0.17
25	160	40	2.21 \pm 0.11	19.89 \pm 0.24
50	120	30	2.19 \pm 0.08	19.85 \pm 0.12
50	160	30	2.21 \pm 0.02	19.82 \pm 0.16

^aMean \pm standard deviation ($n=3$)

^bMean \pm standard deviation ($n=3$)

for both analytes. The method allowed a decrease in both analysis time and volume of chloroform, simplifying the extraction. In addition, the extraction by ultrasound was compared with the manual liquid-liquid extraction using separatory funnels. With the proposed method, the volume of sample decreased from 50 to 10 mL, the chloroform volume decreased from 20 to 10 mL, and the extraction time from 20 min to 30 s in comparison with the manual extraction method.

Analysis of Samples

The proposed method was applied to chocolate products, and the results were compared with those obtained by the stirring method. The results of the analyzed samples and

the obtained recoveries by the proposed ultrasound method are shown in Table 7. The values obtained for each sample were higher by the UAEFM than by the SM itself for chocolate products between 12 and 19 %, and for cacao seeds there was an increase of 40 % for TB and of 57 % for CF, with excellent recoveries. The amounts of TB and CF in the chocolate beverage and syrup were very low, showing that they were elaborated with an insignificant amount of cacao.

Conclusions

The proposed UAEFM was more efficient than the stirring method commonly used for the extraction of these analytes. Moreover, the proposed method was applied in different samples of chocolate with very good results, demonstrating that the ultrasound waves improve the extraction and cause no modification in the extracts. Besides, the results showed a high amount of CF and TB in cacao peel and, therefore, it could be used for the elaboration of chocolate bars and chocolate derivatives instead of cacao seeds or cacao powder. Consequently, it is of paramount importance to establish precise and trustworthy methods such as the proposed ultrasound one for the extraction and measurement of CF and TB in cacao products.

On the other hand, the applications of ultrasound to extract CF from the aqueous extracts from chocolate

Table 7 Concentration obtained of theobromine (TB) and caffeine (CF) in chocolate products and cacao seeds by the proposed ultrasound method (UAEFM) and by the stirring method (SM)

Sample	Method					
	UAEFM ^a			SM ^b		
	CF ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recovery (%)	TB ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recovery (%)	CF ($\mu\text{g g}^{-1}$)	TB ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cacao seeds	2.16 \pm 0.02	100.62 \pm 0.5	25.91 \pm 0.22	101.12 \pm 0.13	1.27 \pm 0.02	13.94 \pm 0.174
Commercial mean powder Hershey's	1.15 \pm 0.08	100.47 \pm 0.5	18.83 \pm 0.17	99.87 \pm 0.21	1.01 \pm 0.04	13.37 \pm 0.17
Chocolate bar 70 % Lindt Excellence	1.41 \pm 0.11	100.10 \pm 0.1	16.77 \pm 0.24	104.09 \pm 0.21	1.20 \pm 0.16	14.38 \pm 0.21
Chocolate bar 85 % Lindt Excellence	1.84 \pm 0.05	100.41 \pm 0.6	20.01 \pm 0.20	100.79 \pm 0.12	1.52 \pm 0.12	16.75 \pm 0.25
Chocolate bar 90 % Lindt Excellence	1.93 \pm 0.07	103.94 \pm 0.90	33.17 \pm 0.18	101.18 \pm 0.57	1.76 \pm 0.09	20.73 \pm 0.26
Chocolate bar 42 % Hershey's	0.95 \pm 0.03	101.14 \pm 1.0	10.75 \pm 0.14	104.69 \pm 0.12	0.80 \pm 0.08	9.50 \pm 0.20
Chocolate bar Tera Bionova	1.04 \pm 0.17	100.09 \pm 0.8	9.78 \pm 0.21	99.00 \pm 0.07	0.85 \pm 0.14	8.79 \pm 0.15
Milky chocolate bar World White	0.49 \pm 0.05	107.40 \pm 0.30	3.89 \pm 0.24	102.74 \pm 0.21	0.46 \pm 0.04	3.49 \pm 0.19
Sugar free chocolate bar Chococore	0.84 \pm 0.09	100.28 \pm 0.33	0.09 \pm 0.16	107.69 \pm 0.20	0.70 \pm 0.11	8.01 \pm 0.23
Chocolate bar Nestlé, Azulejo	1.33 \pm 0.10	98.26 \pm 0.52	16.22 \pm 0.12	100.07 \pm 0.18	1.09 \pm 0.09	11.10 \pm 0.12
Chocolate beverage Hershey's	0.15 \pm 0.08	101.70 \pm 0.71	0.54 \pm 0.15	100.93 \pm 0.21	0.13 \pm 0.07	0.73 \pm 0.07
Chocolate flavor syrup Giant Valle	0.12 \pm 0.08	102.71 \pm 0.10	0.21 \pm 0.15	100.92 \pm 0.25	0.09 \pm 0.02	0.21 \pm 0.05
Milk chocolate bar Nestlé, Cereb V	0.55 \pm 0.05	101.27 \pm 0.44	7.54 \pm 0.15	107.75 \pm 0.14	0.47 \pm 0.06	7.10 \pm 0.15
Cacao peel	1.31 \pm 0.05	99.26 \pm 0.21	25.18 \pm 0.13	100.99 \pm 0.01	1.01 \pm 0.02	13.22 \pm 0.19

^aMean \pm standard deviation ($n=3$)

^bCacao seeds (20 %), sugar, and almonds

products and cocoa seeds allowed a very high precision. Also, the liquid-liquid extraction was simplified.

Acknowledgments The authors are grateful for the financial assistance provided by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) of the Universidad Nacional Autónoma de México (Project No. IT202512-3). The authors are also grateful to Blanca de la Puente Barrios PhD for her translation support.

References

- AOAC Official Method 990.14 (2005). Theobromine and caffeine in cocoa products. Liquid chromatographic method, 31.5.13, 18 Ed.
- Bachelli, P., Brunero, G., Alvarro, V., Lavat, M., & McCarty, J. (2001). Inter-annual variation of sugars, methylxanthine, polyphenols, fatty acids, and endoprotease activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 7946–7951.
- Baunero, M. D. R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambucano, A., & Gómez, A. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100, 429–447.
- Calizares-Macias, M. P., García-Niño, J. A., & López de Castro, M. D. (2004). Fast ultrasound-assisted method for the determination of the oxidative stability of virgin oil. *Analyst Chemistry Acta*, 262, 161–166.
- Candalesa, I., Otero, C. M., Kerdikh, S., & Ashokkumar, M. (2013). Use of power ultrasound to improve extraction and modify phase transition in meat processing. *Food Reviews International*, 28, 67–91.
- Goel, M., Ha, H. Q., Mujumdar, A. S., & Ray, M. B. (2004). Sonochemical decomposition of volatile and non-volatile organic compounds—a comparative study. *Water Research*, 38, 4247–4261.
- González-Núñez, L., & Calizares-Macias, M. P. (2011). Focused microwave-assisted extraction of theobromine and caffeine from cacao. *Food Chemistry*, 129, 1819–1824.
- Hamandi, O., Chiba, M., & Nefkechous, E. (2005). Ultrasound-assisted removal of methylene green from aqueous solution by dead pine needles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 799–807.
- Huang, Q., Haidich, J. L., McKeeven, R. A. J., Markou, F., & Compton, R. G. (1999). The microwave-assisted degradation of trace cyanide and dye stuffs in aqueous media. *New Journal of Chemistry*, 23, 845–849.
- Horák, D., Režek-Janišová, A., Beňušková-Cvitanová, A., Konec, D., & Lelko, V. (2012). Comparison of conventional and ultrasound assisted extraction techniques of yellow tea and bioactive composition of obtained extracts. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2458–2470.
- Konec, D., Beňušková-Cvitanová, A., Horák, D., Demšar, H., Škrábal, S., & Miluševič, B. (2012). Bioactive and sensory properties of herbal spiced chocolate with cocoa (*Theobroma cacao* L.) polyphenolics. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2905–2920.
- Lozano, F., Barreiro, F., Alvarro, G., & Ojopelera, G. (2010). Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cocoa and cocoa seeds by high-performance liquid chromatography. *Anales de Química Orgánica Síntesis*, 15, 273–275.
- López de Castro, M. D., & Priego-Lopate, E. (2008). Analytical applications of ultrasound. *Analytical Chemistry*.
- Lina, F., Cruzilla, D., Chou, L., & Buchelli, P. (2002). Chemical composition and flavor of Brazilian cocoa liquor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3532–3537.
- Mexican Norm, NMX-11-803-SCFI-2004 (2004). Productos agrícolas no industrializados—cacao en grano (*Theobroma cacao* L.). Especificaciones y métodos de prueba. Non industrialized agricultural products, cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) specifications and test methods. Mexico: SICOFOA, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.
- Núñez, M., Ramírez, G., Flores, S., Sakuma, D. O., & Liseron, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolic compounds and methylxanthine content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 617–619.
- Othman, A., Ismail, A., Ghoni, M. A., & Adenan, J. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100, 1522–1530.
- Pinger, D., Polmann-Böke, A. S., Neumayr, C. I., Herold, C. M. G., & Chemt, P. (2012). Laboratory scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111, 73–81.
- Román, E., Franch, A., Castellón, C., Cruz, F. F., Brummer, J., Pulido, M. L., & Carraf, M. (2005). Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 8508–8511.
- Sing, Y. L. J., & Chen, H. (2009). Degradation of Cl- Acid Red 88 aqueous solution by combination of Fenton's reagent and ultrasound irradiation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 573–582.
- Stehová, D., Muzjak, D., Vlcek, J., & Kubín, V. (2004). Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Analyst Chemistry Acta*, 513, 405–414.
- Sunnao, C., Raposo, F. C., McCoun, J., Lo Scalzo, R., Wigger, K. H., Einaffi, I., & Anslan, E. (2006). Effect of roasting on the radical scavenging of cocoa beans. *European Food Research Technology*, 222, 368–375.
- Susick, K. S. (1990). Sonochemistry. *Science*, 247, 1439–1445.
- Shafiq, I., Begeer, J., & Hartaad, S. (1990). Spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa seeds. *Analytica Chimica Acta*, 232, 109–112.
- Tompson, L. H., & Dorakwany, L. K. (1999). Sonochemistry: science and engineering. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 38, 1315–1324.
- Valde-linares, C., & Calizares-Macias, M. P. (2007). On-line dilution and detection of vanillin in vanilla extracts obtained by ultrasound. *Food Chemistry*, 105, 1201–1208.
- Vinoogopal, K., Pillai, J., Manogan, O., & Kuant, P. V. (1998). Ultrasonic mineralization of a reactive textile azo dye, remazol black B. *Water Research*, 32, 3416–3420.
- Vinson, J. A., Wark, J., Bose, P., Michel, S., Miller, P., Shute, N., & Agost, G. A. (2006). Chocolate is a powerful *in vivo* and *in vivo* antioxidant, an antihypertensive agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8071–8076.
- Yamada, T., Yamada, Y., Okano, Y., Terashima, T., & Yokogoshi, H. (2009). Analytic effects of short- and long-term administration of cacao mass on the electrical brain test. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 918–925.

Ultrasound-Assisted Method for Extraction of Theobromine and Caffeine from Cacao Seeds and Chocolate Products

L. Peralta-Jiménez · M. P. Cañizares-Macías

Received: 28 August 2012 / Accepted: 22 November 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract An ultrasound-assisted method for extraction of theobromine (TB) and caffeine (CF) from cacao seeds and chocolate products was developed. This extraction was carried out in 100 mL of heated water at 80 °C by using a 12.7-mm i.d. ultrasound probe and applying 240 W of power for 180 s. In order to quantify TB and CF, the aqueous extracts were treated with Carrez reagent to remove interferences. Then, 10 mL of the aqueous extract was adjusted at pH 12.5 and 10 mL of chloroform solvent was added. Ultrasound radiation was applied at 160 W of power for 30 s in order to transfer CF to the organic phase. The resulting emulsion was centrifuged at 6,000 rpm for 5 min to separate the phases. The photometric monitoring was at 276 nm for CF and at 273 nm for TB. This extraction method is simpler than the conventional liquid–liquid extraction which uses separatory funnels, and obtains similar results. By applying ultrasound in cacao seeds, the efficiency of extraction increased by 57.7 % for CF and 43.6 % for TB and by between 12 and 23 % for both analytes in chocolate products, in comparison with those results obtained by a conventional stirring extraction method.

Keywords Ultrasound-assisted extraction · Theobromine · Caffeine · Cacao seeds · Chocolate products

Introduction

The isolation of the target analytes from a solid matrix is one of the most critical analytical steps. Problems arise such as the possibility of analyte loss or contamination during sample preparation. Besides, it is a time-consuming process and

involves high solvent consumption. The conventional Soxhlet extraction used to extract analytes from solid samples is a well-established model. However, despite being straightforward and cheap, it is slow and tedious.

In the last decade, there has been an increasing demand for new extraction techniques enabling automation, shorter extraction time, and reduction of organic solvents consumption (Sterbová et al. 2004; Valdez-Flores and Cañizares-Macías 2007). Advances in preparation of solid samples have brought about a great number of new techniques such as ultrasonic radiation, which shortens the steps of the analytical process (extraction, reaction, synthesis, and mixing) in comparison with other methods where this energy is not used (Cañizares-Macías et al. 2004; Valdez-Flores and Cañizares-Macías 2007; Chandrapala et al. 2013; Pingret et al. 2012).

Sound waves produce mechanical vibrations in a solid, liquid, or gas and are intrinsically different from electromagnetic waves. Thus, while the latter (radio waves, infrared rays, X-rays, gamma rays, visible or ultraviolet light rays) can pass through a vacuum, sound waves must travel in matter as they involve expansion and compression cycles travelling in a medium. In a liquid, the expansion cycles produce a negative pressure (Suslick 1990). Ultrasonic radiation is generated by immersing the reactor into an ultrasonic bath or directly introducing the source, i.e., a probe (Hong et al. 1999) or a transducer (Vinodgopal et al. 1998) into the reactor. An ultrasonic cleaning bath is the most widely used and cheapest source of ultrasound, but it does not produce better sonochemical effects than probe-type ultrasonic irradiation (Goel et al. 2004).

The most important effects of ultrasound on liquid–solid systems are mechanical and attributed to symmetric as well as asymmetric cavitations. In addition, shockwaves that have potential to create microscopic turbulence are produced within interfacial films surrounding nearby solid particles also referred to as micro-streaming (Thompson and Doraiswamy 1999; Hamdaoui et al. 2008). Asymmetric

L. Peralta-Jiménez · M. P. Cañizares-Macías (✉)
Facultad de Química, Departamento de Química Analítica,
Universidad Nacional Autónoma de México,
México D.F. 04510, México
e-mail: pilarm@unam.mx

collapse leads to the micro-jet formation of solvent that collides with the solid surface with tremendous force, resulting in newly exposed and highly reactive surfaces, as well as corrosion and erosion. These phenomena increase the rate of mass transfer near the surface and enhance the reaction rate (Song et al. 2009). Ultrasound is also known to facilitate extraction processes (Luque de Castro and Priego-Capote 2006; Horžić et al. 2012). The effects of ultrasound on leaching are also essentially primarily related to cavitation. Thus, the implosion of bubbles formed during ultrasound application produces rapid adiabatic compression of gases and vapors within the bubbles or cavities, resulting in an increase of temperature and pressure. The increased temperature enhances the solubility of the analytes in the leachant and facilitates their diffusion from the sample matrix to the outer region; on the other hand, the increased pressure facilitates the penetration of the leachant into the sample matrix, and the analytes transfer from the matrix to liquid phase at the interface.

Cacao is one of the most consumed seeds as ingredient in beverages, pastries, or candies. Cacao products are rich in polyphenols, especially procyanidins, whose concentrations vary depending on their origin (Niemenak et al. 2006; Komes et al. 2012) and processing conditions (Summa et al. 2006). Procyanidins have been found to be health beneficial because of their antioxidant (Othman et al. 2007) and anti-inflammatory properties (Ramiro et al. 2005). Flavonoids from *Theobroma cacao* downregulate inflammatory mediators and anti-atherosclerotic activity (Vinson et al. 2006). In addition to procyanidins, cacao samples also contain alkaloids such as theobromine (TB) and caffeine (CF). These compounds affect the flavor of cacao products (Luna et al. 2002) and have received increasing attention due to their physiological effects (Buchelli et al. 2001). Their importance lies on their incidence over the central nervous system and on the fact that each person reacts differently according to the ingested amount (Yamada et al. 2009).

TB and CF in cacao are found in a quantity of 0.2 and 1.2 %, respectively, but these values depend on variety, harvest, curing process, etc. Therefore, the extraction procedure and quantification of these analytes are important in order to know about the origin and quality of cacao.

Due to the high solubility of TB and CF in water, the extraction of these compounds has been carried out by using this solvent, which allows simple extraction procedures. AOAC method describes the extraction of TB and CF from cacao seeds and cacao products using 95 mL of hot water (100 °C) and by stirring for 25 min (AOAC Official Method 2005). Brunetto et al. (2007) have carried out the extraction of both analytes using hot water at 80 °C and stirring for 5 min. Reflux with water for 60 min has also been used (Lo Coco et al. 2007), but the results have been similar to those obtained by stirring for 5 min (González-Nuñez and

Cañizares-Macías 2011). On the other hand, during these extraction processes, interferents such as polyphenols, proteins, and other compounds with high molecular weight are also extracted and must therefore be removed from the extracts by addition of Carrez I and Carrez II reagents, as they are measured at the same TB and CF wavelengths (Shufen et al. 1990).

In this paper, an aqueous extraction method applying ultrasound to cacao seeds and products of chocolate to extract TB and CF has been developed. For the extraction, an ultrasound probe was used, and the results were compared with those obtained without using ultrasonic waves. The quantification was carried out by UV spectroscopy; therefore, it was necessary to separate CF from aqueous extract with chloroform. This process was carried out by applying ultrasound radiation with a probe while power and irradiation time were evaluated.

Material and Methods

Instrumentation

Ultrasonic irradiation was applied by means of a Branson 450 digital sonifier (20 kHz, 400 W, Danbury, CT, USA) equipped with a cylindrical titanium alloy microprobe (13 mm diameter). A UV–vis spectrophotometer Cary 3 from Varian (Sydney, Australia) was used to measure CF and TB at 276 and 273 nm, respectively. A magnetic stirring (Comarec, Mexico City) with controlled temperature, a centrifuge (HETTICH model EBA 20, Buckinghamshire, England), an oven (Rios Rocha, Mexico City), and a pH meter (Oakton, Vernon Hills, IL, USA) were also used in the treatment of the samples.

Statgraphics Plus 4.0 software (Statistical Graphics, Rockville, MD) was used for the designing of tests and data analysis.

Reagents and Solutions

All used reagents were analytical grade. In order to remove polyphenols and proteins, the obtained aqueous extracts from cacao seeds and chocolate samples were treated with Carrez I solution [24 g of $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (Sigma, Toluca, Mexico) was weighed and dissolved into 100 mL of a 3 % CH_3COOH solution (Merck, Naucalpan, Mexico)] and NaHCO_3 powder (Baker-Mallinkroft, Mexico City). Fats were removed from the cacao seeds with petroleum ether (Baker-Mallinkroft, Mexico City). Chloroform solvent (Baker-Mallinkroft, Mexico City) was used to carry out the extraction of CF from the aqueous extracts. A TB (Fluka, Toluca, Mexico) aqueous stock solution of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ was used to set the TB standard solutions. Chloroform as solvent

was used in order to prepare the CF stock solution (Sigma, Toluca, Mexico) of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. For the extractions with chloroform, the pH of the aqueous extracts was adjusted at 12.5–12.7 with 1.0 mol L^{-1} NaOH.

Samples

The used samples were: (a) cacao seeds from Comalcalco, Tabasco, Mexico, bought at the local market; (b) cacao peels obtained from the Comalcalco cacao seeds; and (c) cacao products such as chocolate bars, chocolate beverages, and commercial cocoa powder.

Samples Treatment

Solid samples of cacao were ground into soft powder in a ceramic mortar. Then, fats were removed with three portions of 5 mL of petroleum ether, shaken for 1 min, and allowed to stand for about 5 min each time. The petroleum ether extracts were combined and then filtered off, and the solvent excess was removed with N_2 . All analyses were carried out using 1 g of defatted sample.

Liquid samples were analyzed without previous treatment using 10 mL of sample.

Procedures

Extraction of TB and CF from Cacao Seeds and Chocolate Products

Ultrasound-assisted extraction method (UAEM) was compared with a validated previously stirring method (SM) (González-Nuñez and Cañizares-Macías 2011).

Stirring Method One hundred milliliters of hot distilled water (80°C) was added to 1 g of sample. The mixture was kept at 80°C and stirred for 5 min. Then, 5 mL of Carrez I was added, and it was stirred for 1 min. The mixture was left to settle until it reached room temperature; later, NaHCO_3 was added until precipitation stopped. The mixture was filtered off, and the remaining filtrate was transferred into a 100-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water. CF was separated from the aqueous extracts by carrying out multiples extractions with chloroform and using separatory funnels (see “Manual extraction” under “Extraction of CF from Aqueous Extracts” section; Shufen et al. 1990; González-Nuñez and Cañizares-Macías 2011).

Extraction of TB and CF from Cacao Seeds by the Proposed Ultrasound-Assisted Extraction Method One gram of solid sample was weighed and poured into a 250-mL beaker, and 100 mL of distilled water at 80°C was added. The ultrasound probe was placed at 1 cm from the top surface of the

liquid phase to allow a better interaction between the sample and the extractant. The ultrasound extraction was carried out at 240 W for 180 s. Next, 5 mL of Carrez I reagent was added, and it was stirred for 1 min. Then, NaHCO_3 was added until precipitation stopped. The mixture was filtered off, and the remaining filtrate was transferred into a 100-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water (solution A). CF was extracted from aqueous extracts with chloroform by applying ultrasound and using the probe (see “Proposed ultrasound extraction” under “Extraction of CF from Aqueous Extracts” section).

For liquid samples, 10 mL of beverage or syrup was diluted up to 100 mL with distilled water. They were directly treated with Carrez I reagent and NaHCO_3 and filtered off.

Validation of the Proposed UAEM for CF and TB A multi-factorial design methodology based on a factorial design 2^3 type V resolution allowing four freedom degrees and involving eight randomized runs plus three centre points was built, in order to carry out a screening study of the main factors affecting the extraction of TB and CF of cacao seeds. Therefore, power, irradiation time, and extractant volume were evaluated. The ANOVA test was calculated by Statgraphics software. Top and bottom values used in the factorial design were established according to previous studies. The evaluated values for the factorial design were: extraction volume (V), 25 mL and 70 mL; irradiation time (IT), 30 and 180 s; and power (P), 40 and 120 W.

With the aim of evaluating possible changes in the studied analytes by the ultrasonic radiation, two mixtures of known concentration of CF and TB (2 and 10 mg L^{-1}) under the same extraction conditions of the samples were analyzed.

In order to study the intra-laboratory reproducibility and repeatability, two independent extractions were also carried out for 7 days. The results were analyzed using an ANOVA test. A study of recoveries adding 2.5 mg of each analyte to 1 g of sample was also carried out.

Measurement of TB and CF from Aqueous Extracts

Extraction of CF from Aqueous Extracts With the purpose of simplifying the CF extraction from aqueous extracts using chloroform solvent as extractant, a novel ultrasound method using a probe was proposed. The method was compared with the conventional liquid–liquid extraction method, which uses separatory funnels and chloroform solvent.

Manual extraction: First of all, 50 mL of the diluted aqueous extracts (see “Stirring method” section) was transferred into a 100-mL separatory funnel, and about 5.5 mL of 1 mol L^{-1} NaOH was added so as to regulate

the pH between 12.5 and 12.7. Then, these extracts were treated with four portions of 5 mL of chloroform, shaken for 1 min, and left to stand for about 5 min each time. After that, the chloroform extracts were combined in a 25-mL volumetric flask and diluted to volume with chloroform. Next, 1 mL of this solution was transferred into another 25 mL volumetric flask and diluted to volume with chloroform so that CF would be measured at 276 nm. The aqueous phase was next transferred into a 100-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water and filtered off. Ten milliliters was transferred into another 100-mL volumetric flask, and 50 mL of distilled water and 0.55 mL 10 % HCl were added. Then, the solution was diluted with distilled water to volume. Finally, 1 mL was transferred into a 25-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water in order to measure TB at 273 (González-Núñez and Cañizares-Macias 2011).

Proposed ultrasound extraction: The conventional liquid–liquid extraction is laborious and requires a great amount of organic solvent. With the aim of both simplifying the liquid–liquid extraction and of decreasing the amount of organic solvent, an ultrasound-assisted extraction method was developed. To begin with, 10 mL of diluted aqueous extract (see “[Extraction of TB and CF from Cacao Seeds by the Proposed Ultrasound-Assisted Extraction Method](#)” section) was transferred into a 50-mL beaker, and about 5.5 mL of 1 mol/L NaOH was added to regulate the pH between 12.5 and 12.7. Then, 10 mL of chloroform was added, and the ultrasound probe was introduced into the glass at 0.5 cm from the top surface of the liquid. Next, a power of 160 W for 30 s was applied. After that, the mixture was separated and centrifuged at 6,000 rpm for 5 min, and 1 mL of chloroform phase was transferred into a 10-mL volumetric flask and diluted to volume with chloroform in order to measure CF. Finally, in order to analyze TB,

1 mL of the aqueous solution was transferred into a 50-mL volumetric flask and diluted to volume with distilled water.

Standard solutions with different concentrations of CF and TB treated under the same extraction conditions of the aqueous extracts were analyzed in order to validate the method, and recoveries were calculated.

Results and Discussions

Calibration Graphics

Two calibration curves were constructed in order to quantify TB and CF in cacao seeds and chocolate products. CF standards were prepared by using chloroform solvent, whereas for the TB ones, aqueous solutions were used. The obtained linear equation for TB was: $Abs=0.06(\pm 0.0003)[TB]+0.018(\pm 0.0035)$ with a linear range between 1 and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a detection limit of 0.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and a regression coefficient of 0.9999. For CF, the equation was: $Abs=0.05(\pm 0.001)[CF]-0.009(\pm 0.011)$ with a regression coefficient of 0.9999, a detection limit of 0.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and linear range from 3 to 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Optimization of the Extraction of TB and CF from Cacao Seeds by the Proposed Ultrasound Method (UAEM)

The cacao seeds used for the analysis were high quality with regard to moisture ($4.5\pm 0.15\%$), pH (5.1 ± 0.25), and fats ($24.6\pm 3.2\%$), in accordance with the specifications of the Mexican norm (NMX-FF-103-2003) (Mexican Norm NMX-FF-103-SCFI-2003 2003). Fats were removed from all the samples as previous studies demonstrated best results for the extraction of TB and CF from cacao seeds when fats are not present (González-Núñez and Cañizares-Macias 2011). The factorial design to evaluate power, irradiation time, as well as extractant volume was constructed in accordance with previous studies, according to which, volumes lower than 25 mL prevent a good mixing between the extractant and the sample. Therefore, 70 mL as maximum volume was selected to minimize the extractant amount and to allow a good mixing. Powers lower than 40 W caused very low extraction of caffeine but, as it considerably increased from this value up, it was selected as minimum value. The maximum power value 120 W was selected to evaluate the effect of power without damaging the probe. The irradiation time values were selected with the aim of decreasing the extraction time in comparison with the

Table 1 Matrix employed for studying the simultaneous effect of three variables, power (P), irradiation time (IT), and volume of extractant (V), on extraction of theobromine (TB) and caffeine from cacao seeds (CF) using an ultrasound extraction-assisted method (UEAM)

Test	V (mL)	P (W)	IT (s)	CF ^a (mg g ⁻¹)	TB ^a (mg g ⁻¹)
1	-1 (25)	+1 (120)	+1 (180)	0.62±0.05	10.99±0.12
2	0 (47.5)	0 (80)	0 (105)	0.75±0.02	13.61±0.09
3	+1 (70)	-1 (40)	+1 (180)	0.64±0.01	13.84±0.15
4	+1 (70)	+1 (120)	-1 (30)	1.03±0.05	16.59±0.09
5	0 (47.5)	0 (80)	0 (105)	0.75±0.04	15.63±0.13
6	-1 (25)	-1 (40)	-1 (30)	0.25±0.02	6.86±0.18
7	-1 (25)	-1 (40)	+1 (180)	0.25±0.03	11.94±0.12
8	-1 (25)	+1 (120)	-1 (30)	0.59±0.04	13.65±0.15
9	+1 (70)	+1 (120)	+1 (180)	0.92±0.03	17.46±0.20
10	+1 (70)	-1 (40)	-1 (30)	0.94±0.02	13.81±0.08
11	0 (47.5)	0 (80)	0 (105)	0.71±0.04	14.46±0.22

Results, coded and real values (in parenthesis) of the variables are indicated

^a Mean±standard deviation
($n=3$)

batch method, but at the same time allowing enough contact time between sample and solvent. Table 1 shows the experimental design used with three central points. The ANOVA results are shown in Tables 2 and 3. The ANOVA table partitions the variability in TB and CF into separate pieces for each one of the effects. This then proves the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. The study was carried out at 95 % confidence level so P values are less than 0.05, indicating that they are significantly different from zero. The extraction volume was statistically significant for CF and TB, but only power was significant for CF. Nevertheless, at higher power, the TB extraction increased, and besides, when the power was low and the irradiation time was long, the extraction of TB and CF increased. Consequently, a second factorial design (2^2) was carried out by increasing the power and maintaining the same values above described for the irradiation time and by using 70 mL of extractant. In Table 4, the matrix employed is shown. After performing the experiments and measuring the response of the ANOVA, tests showed that both factors were not statistically significant. However, with higher irradiation and power, and after longer time, the extracted CF amount increased. Therefore, in order to improve the extraction, power was increased at 240 W (maximum power recommended for the used probe), and the irradiation time was tested at 180 and at 300 s. With this power, the extraction of TB and CF of cacao seeds increased 5 and 2 %, respectively. The increase in irradiation time did not improve the extraction of the analytes. A final test was carried out, in which the volume of extractant at 100 mL was increased. This volume was selected for two reasons: (1) because, in line with the first experimental design, the volume of extractant was an important factor of the extraction for both

analytes; and (2) since this volume had been proved already in the batch method as optimum. The extraction of both analytes was higher, between 2 and 3.2 % for TB and CF, respectively.

As a result, the selected optimum conditions of extraction of TB and CF by the proposed ultrasound extraction method (UAEM) were: $P=240$ W, $IT=180$ s, and $V=100$ mL.

Finally, another test adding Carrez I reagent before and after the extraction using the optimum ultrasound extraction conditions was conducted. The extraction showed better results when the reagent was added afterwards as, when added before, a precipitate was formed and stirring was no efficient.

The precision of the proposed method in terms of within-laboratory reproducibility and repeatability was assessed by using a single experimental setup with duplicates. The repeatability and reproducibility values, expressed as relative standard deviation, showed high precision: 1.11 and 2.90 % for TB, and 4.03 and 4.87 % for CF, respectively.

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for theobromine (TB) at 95 % of confidence level from the results of the factorial design of Table 1

Source	Sum of squares	DF	Mean square	P value
A: V (mL)	41.6785	1	41.6785	0.0311
B: P (W)	18.7272	1	18.7272	0.0942
C: IT (s)	1.3778	1	1.3778	0.5852
AB	0.0392	1	0.0392	0.9252
AC	0.2888	1	0.2888	0.7995
BC	5.95125	1	5.95125	0.2854
Total error	15.6846	4	3.92115	
Total (corr.)	83.7473	10		

V volume, P power, IT irradiation time

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for caffeine (CF) at 95 % of confidence level from the results of the factorial design of Table 1

Source	Sum of squares	DF	Mean square	<i>P</i> value
A: <i>V</i> (mL)	0.41405	1	0.41405	0.0007
B: <i>P</i> (W)	0.1458	1	0.1458	0.0051
C: <i>IT</i> (s)	0.01805	1	0.01805	0.1217
AB	0.01445	1	0.01445	0.1546
AC	0.0242	1	0.0242	0.0859
BC	0.00605	1	0.00605	0.3201
Total error	0.0188182	4	0.00470455	
Total (corr.)	0.641418	10		

V volume, *P* power, *IT* irradiation time

The recoveries obtained with standards in order to evaluate possible changes in the studied analytes under the same extraction conditions of the samples were: between 99.8 and 102.25 % for TB, and between 98.5 and 101.15 % for CF. These results show that the obtained values are within the precision of the method.

Comparative Study Between the UAEM and the SM

Cacao seeds were also analyzed by the SM, and the results were compared with those provided by the UAEM. *F* and *t* tests were conducted using the values of Table 5. The *F* test showed that there was no difference in variances, so the *t* test was calculated through an equal variance. The proposed null hypothesis was: media values of TB and CF in the samples are the same for both methods. The results showed that the values of the media were statistically different as the UAEM proposed method extracted a higher amount of the studied analytes than the SM [the calculated *t* value was higher than the critical value ($t_4=2.78$)]. With the UAEM, the extraction efficiency improved 57 % for CF and 40 % for TB, and

Table 4 Matrix employed for studying the simultaneous effect of the power (*P*) and irradiation time (*IT*) on extraction of theobromine (TB) and caffeine (CF) from cacao seeds (CF) using ultrasound extraction-assisted method (UEAM)

Test	<i>P</i> (W)	<i>IT</i> (s)	CF ^a (mg g ⁻¹)	TB ^a (mg g ⁻¹)
1	0 (180)	0 (105)	1.06±0.02	18.15±0.14
2	-1 (160)	-1 (30)	0.64±0.01	17.69±0.09
3	0 (180)	0 (105)	1.11±0.01	17.23±0.12
4	+1 (200)	+1 (180)	2.02±0.02	20.59±0.24
5	0 (180)	0 (105)	1.22±0.02	17.49±0.13
6	-1 (160)	+1 (180)	0.69±0.03	19.66±0.16
7	+1 (200)	-1 (30)	1.13±0.02	19.04±0.20

Results, coded and real values (in parenthesis) of the variables are indicated. Volume of extractant was adjusted at 70 mL

^a Mean±standard deviation (*n*=3)

Table 5 Determination of caffeine (CF) and theobromine (TB) in cacao seeds using the ultrasound-assisted extraction method (UAEM) and the stirring method (SM)

Sample	UAEM ^a		SM ^a	
	CF (mg g ⁻¹)	TB (mg g ⁻¹)	CF (mg g ⁻¹)	TB (mg g ⁻¹)
Cacao seeds	2.16±0.02	25.91±0.14	1.37±0.02	18.04±0.18
	1.91±0.02	25.19±0.10	1.16±0.015	18.54±0.14

Optimal conditions by UAEM: 240 W, 180 s, and 100 mL of water at 80 °C

^a Mean±standard deviation (*n*=3)

also, the extraction time decreased 60 %. The values were calculated using the average of all measurements.

Evaluation of the Extraction of CF from the Aqueous Extracts of Cacao Seeds Using an Ultrasound Probe

At the same time that the optimization of the TB and CF extraction from cacao seeds was carried out, a study aiming to separate CF and TB with chloroform from the aqueous extracts using the ultrasound probe was also performed. For the optimization, 10 mL of aqueous extract was used; this value was selected as the minimum volume for a good sonication with the 12.7-mm I.D. probe. In order to extract CF from the aqueous phase to the chloroformic phase and keep TB in the aqueous phase, the pH of the aqueous solutions was adjusted at 12.5–12.7 (Shufen et al. 1990). Four combinations of the three key parameters for the extraction of CF such as power, irradiation time, and volume of chloroform were evaluated. The values were selected with the aim of decreasing the extraction time in comparison with separatory funnel extraction. The ultrasound probe was placed at 0.5 cm from the top surface of the liquid. In all the cases, an emulsion was formed within a few seconds after the ultrasound application. As the emulsion existed since the beginning of the extraction, emulsions were disrupted by centrifugation at 6,000 rpm for 5 min after the ultrasonic radiation. The results of the tests are found in Table 6 and showed no statistical difference for any parameter. However, at 160 W, 25 mL, and 40 s, the values were a little higher. With the aim to minimize the method even more, lower volumes of chloroform and shorter irradiation times were tested. A volume of chloroform of 10 mL and an irradiation time of 30 s at 160 W of power were enough to extract CF with efficiency, which was proved by a recovery study using seven aqueous mixtures containing 5 µg mL⁻¹ of CF and 10 µg mL⁻¹ of TB. The solutions were treated under the same conditions used by the proposed method. The results showed recoveries between 99.30 and 102.23 %

Table 6 Evaluation of extraction of caffeine (CF) from aqueous extracts of cacao seeds by applying ultrasonic radiation by means of a probe of 12.7 mm i.d.

Volume of chloroform (mL)	Power (W)	Irradiation time (s)	CF ^a (mg g ⁻¹)	TB ^a (mg g ⁻¹)
25	120	50	2.18±0.07	19.77±0.12
25	160	40	2.21±0.11	19.89±0.24
50	120	50	2.19±0.08	19.85±0.12
50	160	40	2.21±0.05	19.82±0.16

TB theobromine

^a Mean ± standard deviation ($n=3$)

for both analytes. The method allowed a decrease in both analysis time and volume of chloroform, simplifying the extraction in addition. The extraction by ultrasound was compared with the manual liquid–liquid extraction using separatory funnels. With the proposed method, the volume of sample decreased from 50 to 10 mL, the chloroform volume decreased from 20 to 10 mL, and the extraction time from 20 min to 30 s in comparison with the manual extraction method.

Analysis of Samples

The proposed method was applied to chocolate products, and the results were compared with those obtained by the stirring method. The results of the analyzed samples and

the obtained recoveries by the proposed ultrasound method are shown in Table 7. The values obtained for each sample were higher by the UAEM than by the SM itself: for chocolate products between 12 and 19 %, and for cacao seeds there was an increase of 40 % for TB and of 57 % for CF, with excellent recoveries. The amounts of TB and CF in the chocolate beverage and syrup were very low, showing that they were elaborated with an insignificant amount of cacao.

Conclusions

The proposed UAEM was more efficient than the stirring method commonly used for the extraction of these analytes. Moreover, the proposed method was applied in different samples of chocolate with very good results, demonstrating that the ultrasound waves improve the extraction and cause no modification in the extracts. Besides, the results showed a high amount of CF and TB in cacao peel and, therefore, it could be used for the elaboration of chocolate bars and chocolate derivatives instead of cacao seeds or cacao powder. Consequently, it is of paramount importance to establish precise and trustworthy methods such as the proposed ultrasound one for the extraction and measurement of CF and TB in cacao products.

On the other hand, the applications of ultrasound to extract CF from the aqueous extracts from chocolate

Table 7 Concentration obtained of theobromine (TB) and caffeine (CF) in chocolate products and cacao seeds by the proposed ultrasound-assisted extraction method (UAEM) and by the stirring method (SM)

Sample	Method					
	UAEM ^a			SM ^a		
	CF (mg g ⁻¹)	Recovery (%)	TB (mg g ⁻¹)	Recovery (%)	CF (mg g ⁻¹)	TB (mg g ⁻¹)
Cacao seeds	2.16±0.02	100.62±0.5	25.91±0.22	101.12±0.13	1.37±0.02	18.04±0.174
Commercial cocoa powder Hershey's	1.18±0.08	100.43±0.3	18.63±0.12	99.62±0.23	1.01±0.04	15.52±0.12
Chocolate bar 70 % Lindt Excellence	1.48±0.11	100.16±0.1	16.75±0.24	104.00±0.21	1.20±0.16	14.88±0.21
Chocolate bar 85 % Lindt Excellence	1.84±0.05	100.41±0.6	20.01±0.20	100.79±0.12	1.52±0.12	16.75±0.25
Chocolate bar 90 % Lindt Excellence	1.95±0.07	108.9±0.90	23.12±0.18	101.18±0.52	1.56±0.09	20.25±0.26
Chocolate bar 42 % Hershey's	0.95±0.03	101.14±1.0	10.75±0.14	104.60±0.32	0.80±0.08	9.50±0.30
Chocolate bar Turin Exoticas	1.04±0.12	100.09±0.20	9.38±0.21	99.09±0.60	0.85±0.16	8.29±0.15
Milky chocolate bar World table	0.49±0.05	107.49±0.30	3.80±0.24	103.74±0.21	0.40±0.04	3.40±0.19
Sugar free chocolate bar Chocozero	0.84±0.09	100.28±0.53	9.08±0.16	107.69±0.20	0.70±0.11	8.01±0.23
Chocolate bar ^b Nestle, Abuelita	1.33±0.10	98.65±0.62	16.22±0.12	100.07±0.18	1.09±0.09	14.40±0.12
Chocolate beverage Hershey's	0.15±0.08	101.20±0.21	0.34±0.15	100.93±0.21	0.13±0.02	0.28±0.03
Chocolate flavor syrup Great Value	0.12±0.08	102.74±0.10	0.24±0.14	100.92±0.25	0.09±0.02	0.21±0.05
Milk chocolate bar Nestle, Carlos V	0.55±0.05	101.23±0.44	2.36±0.15	102.25±0.14	0.47±0.06	2.10±0.25
Cacao peel	1.31±0.03	99.50±0.51	15.10±0.13	100.96±0.11	1.01±0.02	13.22±0.19

^a Mean±standard deviation ($n=3$)

^b Cacao paste (70 %), sugar, and almonds

products and cacao seeds allowed a very high precision. Also, the liquid–liquid extraction was simplified.

Acknowledgments The authors are grateful for the financial assistance provided by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) of the Universidad Nacional Autónoma de México (Project No. IT202812-3). The authors are also grateful to Blanca de la Puente Barrios PhD for her translation support.

References

- AOAC Official Method 980.14 (2005). Theobromine and caffeine in cacao products. Liquid chromatographic method, 31.5.13. 18 Ed.
- Buchelli, P., Rousseau, G., Alvarez, M., Lavoi, M., & McCarthy, J. (2001). Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5046–5051.
- Brunetto, M. D. R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., & Gómez, A. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100, 459–467.
- Cañizares-Macías, M. P., García-Mesa, J. A., & Luque de Castro, M. D. (2004). Fast ultrasound-assisted method for the determination of the oxidative stability of virgin oil. *Analytica Chimica Acta*, 502, 161–166.
- Chandrapala, J., Oliver, C. M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2013). Use of power ultrasound to improve extraction and modify phase transitions in mean processing. *Food Reviews International*, 29, 67–91.
- Goel, M., Hu, H. Q., Mujumdar, A. S., & Ray, M. B. (2004). Sonochemical decomposition of volatile and non-volatile organic compounds—a comparative study. *Water Research*, 38, 4247–4261.
- González-Nuñez, L., & Cañizares-Macías, M. P. (2011). Focused microwaves-assisted extraction of theobromine and caffeine from cacao. *Food Chemistry*, 129, 1819–1824.
- Hamdaoui, O., Chiha, M., & Naffrechoux, E. (2008). Ultrasound-assisted removal of malachite green from aqueous solution by dead pine needles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 799–807.
- Hong, Q., Hardcastle, J. L., McKeown, R. A. J., Marken, F., & Compton, R. G. (1999). The 20 kHz sonochemical degradation of trace cyanide and dye stuffs in aqueous media. *New Journal of Chemistry*, 23, 845–849.
- Horžić, D., Režek-Jambrak, A., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., & Lelas, V. (2012). Comparison of conventional and ultrasound assisted extraction techniques of yellow tea and bioactive composition of obtained extracts. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2858–2870.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Drmić, H., Škrabal, S., & Miličević, B. (2012). Bioactive and sensory properties of herbal spirit enriched with cocoa (*Theobroma cacao* L.) polyphenolics. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2908–2920.
- Lo Coco, F., Lanuzza, F., Micali, G., & Cappellano, G. (2007). Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cupuacu and cacao seeds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 45, 273–275.
- Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2006). *Analytical applications of ultrasound*. Amsterdam: Elsevier.
- Luna, F., Cruzillat, D., Cirou, L., & Buchelli, P. (2002). Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3527–3532.
- Mexican Norm, NMX-FF-103-SCFI-2003 (2003). Productos agrícolas no industrializados- cacao en grano (*Theobroma cacao* L.). Especificaciones y métodos de prueba. Non-industrialized agricultural products cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) specifications and test method. Mexico: SECOFI: Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumon, D. O., & Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L) clones in terms of their phenolic compounds and anthocyanins content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 612–619.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100, 1523–1530.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Bourvellec, C. L., Renard, C. M. G. C., & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111, 73–81.
- Ramiro, E., Franch, A., Castellote, C., Cano, F. P., Permanyer, J., Pulido, M. I., & Castell, M. (2005). Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 8506–8511.
- Song, Y., Li, J., & Chen, H. (2009). Degradation of C.I. Acid Red 88 aqueous solution by combination of Fenton's reagent and ultrasound irradiation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 578–583.
- Sterbová, D., Matejíček, D., Vlcek, J., & Kubán, V. (2004). Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Analytica Chimica Acta*, 513, 435–444.
- Summa, C., Raposo, F. C., McCourt, J., Lo Scalzo, R., Wagner, K. H., Elmadda, I., & Anklam, E. (2006). Effect of roasting on the radical scavenging of cocoa beans. *European Food Research Technology*, 222, 368–375.
- Suslick, K. S. (1990). Sonochemistry. *Science*, 247, 1439–1445.
- Shufen, L., Berger, J., & Hartland, S. (1990). Spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa seeds. *Analytica Chimica Acta*, 232, 409–412.
- Thompson, L. H., & Doraiswamy, L. K. (1999). Sonochemistry: science and engineering. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 38, 1215–1249.
- Valdez-Flores, C., & Cañizares-Macías, M. P. (2007). On-line dilution and detection of vanillin in vanilla extracts obtained by ultrasound. *Food Chemistry*, 105, 1201–1208.
- Vinodgopal, K., Peller, J., Makogon, O., & Kamat, P. V. (1998). Ultrasonic mineralization of a reactive textile azo dye, remazol black B. *Water Research*, 32, 3646–3650.
- Vinson, J. A., Proch, J., Bose, P., Mucheler, S., Taffera, P., Shuta, N., & Agbor, G. A. (2006). Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8071–8076.
- Yamada, T., Yamada, Y., Okano, Y., Terashima, T., & Yokogoshi, H. (2009). Anxiolytic effects of short- and long-term administration of cacao mass on rat elevated T-maze test. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 948–955.